

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2016/2017

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DA *CHLORELLA*
VULGARIS NUM NOVO FOTOBIORREATOR TUBULAR**

ALCINDA PATRÍCIA DE CARVALHO LOPES

Dissertação submetida para obtenção do grau de
MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Maria Cristina da Costa Vila
Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia de Minas da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto

Orientador académico: Doutor José Carlos Magalhães Pires
Investigador Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto

Co-Orientador: Doutor Vítor Jorge Pais Vilar
Investigador Principal do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto

Co-Orientadora: Tânia Filomena Castro Valente Silva
Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia Química da
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Porto, julho de 2017

AGRADECIMENTOS

A realização do presente estudo só foi possível devido ao contributo e partilha de conhecimentos de um conjunto de pessoas, as quais merecem o meu apreço e sincero agradecimento.

Ao Doutor José Carlos Pires, com certeza o meu principal apoio na realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento pela forma extraordinária como acompanhou todo este processo. Desde a inexcedível disponibilidade que sempre demonstrou até à busca incessante de como ultrapassar os desafios que iam surgindo, e que foram muitos, na realização deste trabalho. Dirijo também ao Doutor Vítor Vilar uma enorme palavra de apreço por toda a sua disponibilidade, a ajuda prestada e por disponibilizar todo o material necessário à elaboração deste estudo. Estou também muita grata à Doutora Tânia Valente por toda a disponibilidade, empenho e dedicação que demonstrou a todos os níveis durante a elaboração deste estudo. Agradeço também ao Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Biotecnologia e Energia (LEPABE) e ao Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. A toda a equipa do Laboratório E404, em particular, ao Engenheiro Inalmar Segundo e ao Engenheiro Jonathan Espíndola o meu sincero agradecimento por todo o apoio prestado na utilização dos equipamentos de análise.

Não queria deixar de agradecer a todos os meus amigos que, de forma ou de outra, acrescentaram sempre alguma alegria nos dias mais complicados, em particular, à Márcia Carvalho por todo o apoio e incentivo que prestou sempre de forma incondicional.

Por último e não menos importante, queria agradecer à minha família por todo o apoio prestado ao longo de todos estes anos, em especial aos meus pais e ao meu irmão por sempre acreditarem em mim e nunca duvidarem das minhas capacidades.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto:

- (i) POCI-01-0145-FEDER-006939 (LEPABE, UID/EQU/00511/2013) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.

- (ii) NORTE-01-0145-FEDER-000005 – LEPABE-2-ECO-INNOVATION, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).
- (iii) POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



RESUMO

O crescimento contínuo da população urbana representa uma grave ameaça para o meio ambiente devido à produção de grandes quantidades de águas residuais municipais e industriais. A descarga destes efluentes representa sérios desafios ambientais para os corpos de água recetores. Um dos problemas associados à descarga de águas residuais ricas em compostos orgânicos e inorgânicos (nitratos e fosfatos) é principalmente a eutrofização. Este é um problema a nível mundial que pode ser mitigado através da introdução das microalgas no tratamento de águas residuais, uma vez que estes efluentes podem ser utilizadas como meio de cultura para o crescimento de microalgas. Deste modo, a utilização das microalgas em processos de tratamento de águas residuais é desejável, uma vez que estas são capazes de desempenhar um duplo papel: remoção de nutrientes e produção de biomassa. A biorremediação de águas residuais pelas microalgas apresenta algumas vantagens, entre as quais o facto de ser um processo ecológico e sem poluição secundária, desde que a biomassa produzida seja reutilizada e permita a reciclagem eficiente de nutrientes. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o crescimento da microalga *C. vulgaris* num novo fotobiorreator com coletores parabólicos compostos em condições *outdoor*, tendo em conta a produtividade de biomassa (e eficiência fotossintética obtida neste sistema de produção) e remoção de nutrientes sob diferentes condições de cultivo (intensidade de radiação e caudal de fluído).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível confirmar o potencial das microalgas para produção de biomassa e remoção de nutrientes presentes nas águas residuais, principalmente azoto e fósforo. A produtividade de biomassa máxima registada foi de $4,6 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nas melhores condições de cultivo obtiveram-se eficiências elevadas de remoção de azoto (99%). Em contrapartida, a remoção de fósforo apresentou eficiências um pouco mais baixas, mas ainda assim razoáveis (55%). As cinéticas de remoção de ambos os nutrientes (azoto e fósforo) foram determinadas, em função do tempo de cultivo e da energia visível acumulada, através do ajuste a um modelo cinético de pseudo-primeira ordem. Por fim, a eficiência fotossintética máxima obtida foi de 0,31%.

Em suma, sendo o presente trabalho realizado em condições *outdoor*, este apresenta dados relevantes para o cultivo de microalgas em águas residuais, com o objetivo de produzir biomassa e remover poluentes que podem causar eutrofização.

Palavras-chave: Biomassa; *Chlorella vulgaris*; Coletores parabólicos compostos; Eficiência fotossintética; Fotobiorreator tubular; Integração de processos; Tratamento de águas residuais; Remoção de nutrientes; Sustentabilidade.

ABSTRACT

The growth of urban population poses a serious threat to the environment due to the release of high amounts of industrial and municipal wastewater. The release of these effluents represents serious environmental challenges to the receiving water bodies. The major effect of releasing wastewater rich in organic compounds and inorganic chemicals such as phosphates and nitrates is mainly eutrophication. This is a global problem that can be solved by the use of microalgae whereby the wastewater is used as microalgal culture medium. The use of microalgae is desirable since they present a dual role of wastewater bioremediation: nutrient removal and biomass production. The wastewater bioremediation by microalgae has several advantages such as being an eco-friendly process with no secondary pollution as long as the produced biomass is reused and allows efficient nutrient recycling. Therefore, this study aims to evaluate the growth of the microalgae *C. vulgaris* in a new photobioreactor with compound parabolic collectors in outdoor conditions, taking into account the biomass productivity (and the photosynthetic efficiency obtained with this production system) and the nutrients (nitrogen and phosphorus) removal under different culture conditions (light intensity and volumetric flow rate).

According to the achieved results, microalgae showed the potential to produce biomass and to remove nutrients from wastewater, mainly nitrogen and phosphorus. The maximum biomass productivity was $4,6 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. When the microalgae were exposed to the best culture conditions, a high efficiency rate of nitrogen removal (99%) was reached. On the other hand, the phosphorus removal has shown lower efficiency values but still reasonable (55%). The nutrients removal kinetics were set according to the cultivation time and the accumulated visible light through the first-order kinetic models adjustment. The maximum photosynthetic efficiency was 0,31%.

In short, as this experiment was performed in outdoor conditions, it presents important data for the microalgae's cultivation in wastewater in order to produce biomass and remove pollutants, which may be responsible for eutrophication.

Keywords: Biomass; *Chlorella vulgaris*; Compound parabolic collectors; Nutrients removal; Photosynthetic efficiency; Process integration; Sustainability; Tubular photobioreactor; Wastewater treatment.

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento.....	1
1.2	Objetivos	2
1.3	Organização da tese	2
2	Revisão da literatura	5
2.1	Microalgas	5
2.1.1	Características das microalgas.....	5
2.1.2	Metabolismos celulares.....	6
2.1.3	Condições de crescimento.....	6
2.1.4	Tecnologias de cultivo de microalgas	10
2.1.5	Aplicações das microalgas	12
2.2	Tratamentos presentes numa ETAR.....	13
2.2.1	Tratamento preliminar	13
2.2.2	Tratamento primário	13
2.2.3	Tratamento secundário	14
2.2.4	Tratamento terciário	14
2.2.5	Desinfecção	16
2.3	Microalgas na depuração de águas residuais.....	17
2.3.1	Remoção de nutrientes	17
2.3.2	Limitações dos tratamentos convencionais	18
2.3.3	Benefícios das microalgas nas ETARs	19
2.3.4	Redução dos custos de operação	20
2.4	Limitações das microalgas no tratamento de águas residuais.....	20
2.4.1	Variabilidade da temperatura	21
2.4.2	Ciclo luz/escuro.....	21
2.4.3	Competição com a microflora presente nas águas residuais	22

2.4.4	Colheita da biomassa	22
2.4.5	Qualidade da água residual	23
3	Material e métodos	25
3.1	Meio de cultura e microrganismo	25
3.2	Instalação experimental	25
3.3	Métodos de análise	27
3.4	Modelos cinéticos.....	29
4	Resultados e discussão.....	33
4.1	Temperatura.....	33
4.2	Carbono e pH.....	33
4.3	Produção de biomassa	35
4.4	Remoção de nutrientes	39
4.4.1	Azoto.....	39
4.4.2	Fósforo.....	42
4.5	Eficiência fotossintética.....	45
5	Conclusão	47
6	Avaliação do trabalho realizado.....	49
6.1	Objetivos realizados	49
6.2	Limitações e trabalho futuro	49
	Referências.....	51
A.	Anexos: Material e métodos	63
A.1	Esquema da instalação piloto utilizada	63
A.2	Instalação piloto	64
A.3	Procedimento experimental de peso seco.....	65
A.4	Cálculo do erro padrão.....	66
B.	Resultados e discussão.....	67
B.1	Ensaio I	67
B.2	Ensaio II	68

B.3	Ensaio III	69
B.4	Ensaio IV	70
B.5	Ensaio V	71
B.6	Variação da concentração de Cálcio e Fósforo no ensaio IV.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - CURVA DE RESPOSTA DA FOTOSSÍNTESE À LUZ (ADAPTADO DE RICHMOND (2004)).	10
FIGURA 2.2 – SISTEMA DE CULTIVO EM CIRCUITO (<i>RACEWAY</i>) (ADAPTADO DE WALTER (2011)).	10
FIGURA 2.3 - FOTOBIOREATOR TUBULAR COM TUBOS PARALELOS E HORIZONTAIS (ADAPTADO DE CHISTI (2007)).	12
FIGURA 2.4 - TRATAMENTO DE LAMAS ATIVADAS (ADAPTADO DE EPA (1997)).	14
FIGURA 2.5 - PRÉ-DESNITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA (ADAPTADO DE EPA (1997)).	15
FIGURA 2.6 - PÓS-DESNITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA (ADAPTADO DE EPA (1997)).	15
FIGURA 2.7 - PONTOS DE DOSAGEM PARA A PRECIPITAÇÃO QUÍMICA DO FÓSFORO (ADAPTADO DE EPA (1997)).	16
FIGURA 2.8 - VISÃO GERAL DO PROCESSO DE TROCA DE NUTRIENTES MICROALGAS-BACTÉRIAS EM ÁGUAS RESIDUAIS (ADAPTADO DE ANBALAGAN (2016)).	22
FIGURA 3.1 - INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL UTILIZADA.	26
FIGURA 4.1 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO (CID) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	34
FIGURA 4.2 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO TOTAL DISSOLVIDO (CTD) EM FUNÇÃO DO TEMPO NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	35
FIGURA 4.3 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	36
FIGURA 4.4 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ENERGIA VISÍVEL ACUMULADA NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	37
FIGURA 4.5 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AZOTO INORGÂNICO EM FUNÇÃO DO TEMPO NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	39
FIGURA 4.6 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AZOTO INORGÂNICO EM FUNÇÃO DA ENERGIA VISÍVEL ACUMULADA NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	40
FIGURA 4.7 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO INORGÂNICO EM FUNÇÃO DO TEMPO NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	43
FIGURA 4.8 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO INORGÂNICO EM FUNÇÃO DA ENERGIA VISÍVEL ACUMULADA NO FBR1 (A) E FBR2 (B).	44
FIGURA A.1 - ESQUEMA DA INSTALAÇÃO PILOTO UTILIZADA.	63
FIGURA A.2 - INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL NO ÚLTIMO DIA DE CULTIVO DO ENSAIO I.	64
FIGURA B.1 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO I, FBR1.	67
FIGURA B.2 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO I, FBR2.	67
FIGURA B.3 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO II, FBR1.	68
FIGURA B.4 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO II, FBR2.	68
FIGURA B.5 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO III, FBR1.	69
FIGURA B.6 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO III, FBR2.	69
FIGURA B.7 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO IV, FBR1.	70
FIGURA B.8 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO IV, FBR 2.	70
FIGURA B.9 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO V, FBR1.	71
FIGURA B.10 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO V, FBR2.	71
FIGURA B.11 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO E CÁLCIO EM FUNÇÃO DO TEMPO, NO FBR1.	72

FIGURA B.12 - EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO E CÁLCIO EM FUNÇÃO DO TEMPO, NO FBR2.....	72
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - REMOÇÃO DE NUTRIENTES DAS ÁGUAS RESIDUAIS COM CULTURAS DE MICROALGAS EM SUSPENSÃO.	18
TABELA 3.1 - CONDIÇÕES QUE FORAM REALIZADOS OS DIFERENTES ENSAIOS.	27
TABELA 3.2 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.	28
TABELA 4.1 - TEMPERATURAS REGISTRADAS NOS ENSAIOS	33
TABELA 4.2 - PARÂMETROS RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE BIOMASSA.	38
TABELA 4.3 - PARÂMETROS REFERENTES À REMOÇÃO DE AZOTO INORGÂNICO.	41
TABELA 4.4 - RENDIMENTOS ESPECÍFICOS DE BIOMASSA EM TERMOS DE AZOTO.	42
TABELA 4.5 - PARÂMETROS REFERENTES À REMOÇÃO DE FÓSFORO INORGÂNICO.	44
TABELA 4.6 - RENDIMENTOS ESPECÍFICOS DA BIOMASSA EM TERMOS DE FÓSFORO.	45
TABELA 4.7 - EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DO FBR.	46

NOTAÇÃO E GLOSSÁRIO

Símbolos

ER	Eficiência de remoção	%
k_{N1}	Constante cinética de remoção de NO_3^- em função do tempo	h^{-1}
k_{N2}	Constante cinética de remoção de NO_3^- em função da energia visível acumulada	$\text{L} \cdot \text{kJ}^{-1}$
k_{P1}	Constante cinética de remoção de PO_4^{3-} em função do tempo	h^{-1}
k_{P2}	Constante cinética de remoção de PO_4^{3-} em função da energia visível acumulada	$\text{L} \cdot \text{kJ}^{-1}$
pH	Potencial de hidrogénio	
P_x	Produtividade em biomassa	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
S	Concentração do nutriente	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
t	Tempo	h
TR	Taxa de remoção	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
X	Concentração de biomassa	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$Y_{X/S}$	Rendimento específico de biomassa (b) em termos de nutrientes (S)	$\text{g}_b \cdot \text{g}_S^{-1}$

Letras gregas

μ	Taxa específica de crescimento	h^{-1}
δ	Erro padrão	
σ	Desvio-padrão	
Δ	Variação	

Índices

b	Biomassa
c	Cultivo
f	Instante final
i	Índice ou contador
max	Máximo
med	Médio
min	Mínimo
N	Azoto
P	Fósforo
S	Nutrientes
0	Instante inicial

Lista de siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CBO	Carência bioquímica de oxigénio
CID	Carbono inorgânico dissolvido
COD	Carbono orgânico dissolvido
CPC	Coletor parabólico composto
COD	Carbono orgânico dissolvido
DO_{440}	Densidade ótica a 440 nm

ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
FBR	Fotobiorreator
HAP	Hidroxiapatite
NDIR	<i>Non-dispersive infrared</i>
Re	<i>Reynolds</i>
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
UV	Radiação ultravioleta
VIS	Radiação visível
VLE	Valor limite de emissão

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

A crise global de água deve-se principalmente ao crescimento populacional em áreas com escassez de água doce, à poluição da água superficial e subterrânea e às alterações do ciclo hidrológico resultantes das alterações climáticas (Pasqualino *et al.*, 2011). A produção de águas residuais em larga escala é uma consequência inevitável das sociedades contemporâneas (Lau *et al.*, 1997). As águas residuais são geralmente perigosas para a população e para o meio ambiente devendo, por isso, ser tratadas antes de serem descarregadas em rios, lagos, mares e superfícies terrestres. Através de práticas agrícolas, industriais, urbanísticas e outras, o Homem tem aumentado a entrada de nutrientes nos ciclos bioquímicos, especialmente azoto e fósforo (de-Bashan e Bashan, 2004). Estes nutrientes são diretamente responsáveis pela eutrofização.

A eutrofização é caracterizada pelo crescimento excessivo de plantas e algas devido à maior disponibilidade de um ou mais fatores limitantes de crescimento necessários à fotossíntese, como a luz solar, o dióxido de carbono (CO_2) e outros nutrientes (Schindler, 2006). Este crescimento excessivo limita a penetração de luz nos corpos de água, reduzindo o crescimento e causando a morte de plantas nas zonas litorais (Lehtiniemi *et al.*, 2005). Para além disso, elevadas taxas de fotossíntese, associadas à eutrofização, podem esgotar o carbono inorgânico dissolvido e aumentar o pH da água para níveis extremos durante o dia (Turner e Chislock, 2010). Por fim, quando estas algas e plantas morrem, a decomposição microbiana esgota o oxigénio dissolvido, criando zonas anóxicas ou hipóxicas, sem oxigénio suficiente para suportar a maioria dos organismos marinhos (Arend *et al.*, 2011).

No sentido de diminuir a entrada dos nutrientes responsáveis pela eutrofização, vários têm sido os esforços para encontrar soluções. Deste modo, diversos estudos demonstraram que as microalgas possuem um grande potencial para remover azoto e fósforo (Bich *et al.*, 1999; Hoffmann, 1998). Os principais mecanismos das algas para removerem nutrientes das águas residuais incluem a absorção e remoção de amónio através da volatilização do amoníaco resultante do aumento de pH. Apesar de as microalgas se apresentarem bastante promissoras na remoção destes nutrientes das águas residuais, a sua introdução como uma etapa de tratamento nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) ainda carece de mais estudos, uma vez que ainda existem obstáculos que têm de ser ultrapassados, tais como a

variabilidade diária e sazonal de parâmetros de cultivo (temperatura, intensidade de radiação e ciclo luz/escuro, entre outros) e a colheita da biomassa.

1.2 Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo da eficiência fotossintética da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada num novo fotobiorreator tubular com coletores parabólicos compostos (CPCs) em condições *outdoor*. Os objetivos específicos são: (i) avaliar a produção de biomassa para diferentes condições de cultivo; (ii) analisar a remoção de azoto e fósforo de águas residuais sintéticas; e (iii) determinar os modelos cinéticos associados a ambos os processos.

O estudo do crescimento desta espécie permitiu obter dados que foram úteis para avaliar a eficiência de produção de biomassa. Para além da determinação da produtividade de biomassa, pretendeu-se ainda estimar a velocidade de crescimento das microalgas, sob diferentes condições de cultivo. Este estudo permitiu avaliar as condições ótimas para o crescimento da microalga nesta nova configuração de fotobiorreator.

Através de uma composição conhecida *a priori* do meio de cultura, pretendeu-se estudar as velocidades de remoção de azoto (na forma de nitratos) e fósforo (na forma de fosfatos) presentes nas águas residuais. Este estudo apresenta dados relevantes quanto ao potencial das microalgas para o tratamento de águas residuais.

1.3 Organização da tese

Esta dissertação encontra-se dividida em 6 capítulos. O Capítulo 1 apresenta as principais problemáticas associadas ao tema em estudo, bem com os principais objetivos do trabalho e a organização do presente documento.

O Capítulo 2 apresenta a revisão crítica da literatura. Neste capítulo as principais características e aplicações das microalgas são descritas, bem como as suas condições de crescimento e tecnologias existentes. As principais etapas de tratamento de águas residuais, presentes numa ETAR, e as vantagens e desvantagens da introdução das microalgas como uma etapa de tratamento numa ETAR, também são aqui mencionadas.

O Capítulo 3 descreve a instalação piloto utilizada, bem como os métodos experimentais utilizados e as condições de cultivo estudadas. Para além disto, está também presente neste capítulo os modelos cinéticos aplicados no presente trabalho.

O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos na avaliação do crescimento da microalga em estudo num efluente sintético, bem como a eficiência fotossintética da microalga no fotobiorreator utilizado.

O Capítulo 5 apresenta as principais conclusões retiradas com o desenvolvimento do presente trabalho. Os principais resultados, de forma sumária, são também aqui apresentados, por forma a permitir uma conclusão rápida sobre o estudo.

Por fim, o Capítulo 6 avalia qualitativamente o trabalho realizado, tendo em vista o objetivos estipulados. Neste capítulo são ainda apresentadas as principais limitações encontradas na realização deste projeto, bem como sugestões para trabalhos futuros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo apresenta as principais características das microalgas, bem como os tipos de tratamento presentes numa ETAR e as principais vantagens e obstáculos encontrados aquando da integração do cultivo das microalgas como etapa de tratamento de águas residuais.

2.1 Microalgas

2.1.1 Características das microalgas

De acordo com a divisão taxonómica, as algas podem pertencer ao domínio procariota ou eucariota (Richmond, 2004). Relativamente aos organismos procariotas, as cianobactérias (também conhecidas como cianofíceas ou algas verde-azuladas) são as únicas algas pertencentes a este grupo. Por outro lado, no domínio eucariota, existem várias classes de algas, sendo as mais relevantes em termos de aplicação prática as seguintes: algas verdes (*Chlorophyceae*), algas douradas (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*). As algas estão presentes mais frequentemente na água, seja ela doce, salgada ou salobra (Lam *et al.*, 2017; Lee, 2008). No entanto, as algas podem também ser encontradas em todos os outros ambientes terrestres, como por exemplo na neve ou em fontes termais. Na maioria dos habitats, as algas funcionam como os produtores primários na cadeia alimentar, produzindo, através da fotossíntese, matéria orgânica a partir de energia solar, dióxido de carbono, água e nutrientes (como por exemplo, azoto e fósforo). Além de constituírem a fonte básica de alimento para essas cadeias alimentares, também produzem o oxigénio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores.

As algas constituem um grupo de organismos extremamente heterogéneo. Para serem designadas de microalgas, os organismos têm de ser pequenos, normalmente microscópicos, unicelulares (mas podem ser colónias com pouca ou nenhuma diferenciação celular) e coloridos, devido aos pigmentos fotossintéticos (Olaizola, 2003). As microalgas contêm uma quantidade significativa de lípidos na forma de ácidos gordos, os quais podem ser extraídos para subsequente produção de biodiesel, sendo este um dos vários produtos que se podem obter a partir da biomassa (Lam *et al.*, 2017).

A *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*, microalga utilizada no presente trabalho) pertencente à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae* (Hoek *et al.*, 1995). A *C. vulgaris* é uma alga unicelular de água doce capaz de acumular pigmentos como a clorofila *a* e *b*, β -caroteno e xantofilas (Esteves, 1998; Hoek *et al.*, 1995; Raven *et al.*, 2001; Richmond, 2004).

Esta microalga possui diferentes vias de reprodução, tais como a reprodução sexual, a divisão binária e os esporos assexuais. O amido é a principal forma de reserva da *C. vulgaris*, contudo sob determinadas condições pode armazenar óleo. Diferentes estudos têm mostrado que a *C. vulgaris* é capaz de tratar vários tipos de águas residuais, incluindo águas residuais têxteis (Chu *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010), de suinicultura (Godos *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2013), industriais (Valderrama *et al.*, 2002) e domésticas (Cho *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011).

2.1.2 Metabolismos celulares

As algas são capazes de crescer com diferentes tipos de metabolismos celulares centrados nas principais formas de nutrição, nomeadamente a autotrofia e a heterotrofia (Richmond, 2004). Assim, as microalgas podem crescer com base em 4 tipos de metabolismos celulares: fotoautotrófico, quimioheterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico.

Os organismos fotoautotróficos obtêm a energia e os eletrões (necessários para a redução do CO₂) através da absorção da energia solar e da oxidação de substratos (principalmente água), respetivamente (Richmond, 2004). Por outro lado, os organismos quimioheterotróficos utilizam unicamente compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (Abreu *et al.*, 2012). No que diz respeito ao crescimento sob condições mixotróficas, este é equivalente ao crescimento sob condições autotróficas e heterotróficas, uma vez que, dependendo das condições de cultivo, tanto compostos orgânicos como CO₂ podem ser assimilados pelas microalgas (Richmond, 2004). Assim, os microrganismos cultivados sob condições mixotróficas sintetizam compostos característicos de ambos os tipos de metabolismos (autotrófico e heterotrófico), apresentando elevadas taxas de produção (Cerón García *et al.*, 2005). Quanto ao metabolismo celular fotoheterotrófico, os organismos requerem energia luminosa como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono (Richmond, 2004).

2.1.3 Condições de crescimento

O crescimento da cultura, bem como a composição bioquímica da sua biomassa não são apenas determinados pela espécie da microalga em cultivo (Rocha, 2012). Os nutrientes presentes no meio de cultura, o pH, a intensidade luminosa e a temperatura são alguns dos parâmetros que podem influenciar quer o crescimento, quer a composição bioquímica das microalgas.

Nutrientes

Segundo Chisti (2007), a fórmula molecular da biomassa das microalgas é $\text{CO}_{0,48}\text{H}_{1,83}\text{N}_{0,11}\text{P}_{0,01}$. Assim, os nutrientes mais importantes para o crescimento autotrófico (designados por macronutrientes) são o carbono (C), o azoto (N) e o fósforo (P) (Richmond, 2004).

O carbono é o macronutriente necessário em concentrações mais elevadas, pois é o principal constituinte de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, tais como proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, vitaminas e lípidos (Richmond, 2004). As microalgas dispõem de duas vias de assimilação de carbono inorgânico: difusão ($5,0 < \text{pH} < 7,0$) e transporte ativo ($\text{pH} > 7,0$) (Gonçalves et al., 2017). De modo a atingir elevadas taxas de produção autotrófica, o fornecimento de CO_2 e bicarbonatos (HCO_3^-) é o mais importante (Richmond, 2004). Para determinadas espécies de microalgas que cresçam sob condições mixotróficas, podem ser utilizados compostos orgânicos, tais como açúcares, ácidos e álcoois como fonte de carbono.

O azoto assume também um papel importante, uma vez que é um elemento básico para a formação de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, hormonas e pigmentos fotossintéticos (Richmond, 2004). O mecanismo de assimilação do nitrato e do amónio (NH_4^+) pelas microalgas é o transporte ativo (Gonçalves et al., 2017). O azoto é maioritariamente fornecido sob a forma de nitrato (NO_3^-), mas, por vezes, o amónio (NH_4^+) e a ureia também podem ser utilizados (Richmond, 2004). Silva et al. (2015) avaliaram a fonte preferencial de azoto (NO_3^- e NH_4^+) para duas espécies de microalgas (*C. vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata*). Através deste estudo, Silva et al. (2015) concluíram que o amónio era a fonte preferencial de azoto para microalga *C. vulgaris*, uma vez que esta espécie química é a que implica um menor consumo de energia na sua assimilação por parte das microalgas (Jia et al., 2017). Tipicamente, quando as microalgas se encontram limitadas pelo azoto ocorre uma descoloração das células (diminuição das clorofilas e aumento dos carotenoides) e uma acumulação de compostos orgânicos, tais como polissacarídeos e alguns óleos (Becker, 1994). Goiris et al. (2015) estudaram o impacto da limitação de nutrientes na produção de antioxidantes em três espécies de microalgas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* e *C. vulgaris*). Através deste estudo, Goiris et al. (2015) concluíram que o conteúdo de clorofila *a* na biomassa foi significativamente mais baixo quando as microalgas estavam limitadas pelo azoto.

Por fim, o fósforo é essencial para o crescimento e para muitos processos celulares, tais como transferência energética, síntese de ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN), entre outros (Richmond, 2004). À semelhança do azoto, também o fósforo é assimilado pelas

microalgas através do transporte ativo (Gonçalves et al., 2017). Este elemento químico é adicionado preferencialmente na forma de orto-fosfato (PO_4^{3-}) e a sua absorção é energeticamente dependente (Richmond, 2004). O fornecimento de fósforo também influencia a composição da biomassa produzida (Borowitzka, 1988). O conteúdo de lípidos e hidratos de carbono é especialmente afetado pelo fornecimento interno e externo de fósforo. O rácio N:P no meio de cultura também é importante, uma vez que não só influencia a produtividade como também influencia as espécies dominantes na cultura (Richmond, 2004). Em 1934, Alfred C. Redfield estimou, através composição elementar das células de microalgas, o valor da razão N:P como sendo 16:1 (denominada como razão de Redfield), no entanto, vários estudos já testaram diferentes razões (Martin et al., 1987; Minster e Boulahdid, 1987; Shaffer et al., 1999; Takahashi et al., 1985). Silva et al. (2015) avaliaram o efeito da razão N:P no crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *P. subcapitata*. As razões N:P avaliadas foram 8:1, 16:1 e 24:1, sendo que a razão N:P de 8:1 foi a que mais favoreceu o crescimento da microalga *C. vulgaris*.

Para além do C, N e P existem outros nutrientes que também são importantes, tais como o enxofre (S), o potássio (K), o sódio (Na), o ferro (Fe), o magnésio (Mg) e o cálcio (Ca) (Richmond, 2004). Para além destes, outros elementos vestigiais são importantes (micronutrientes), como por exemplo o boro (B), o cobre (Cu), o manganês (Mn), o zinco (Zn), o molibdénio (Mo), o cobalto (Co), o vanádio (V) e o selénio (Se).

pH

Durante a fixação fotossintética do CO_2 , o hidróxido (OH^-) acumula-se no meio de crescimento, conduzindo a um aumento gradual do pH (Richmond, 2004). O aumento do pH desloca o equilíbrio químico do carbono inorgânico presente no meio no sentido da formação de carbonatos (CO_3^{2-}), no entanto estes não são a fonte preferencial de carbono para as microalgas (Lower, 1999). Por outro lado, a diminuição do pH desloca o equilíbrio no sentido da formação de CO_2 , que é uma das fontes de carbono preferenciais para as microalgas. Contudo, este processo pode conduzir à libertação de CO_2 para a atmosfera e consequentemente à diminuição da concentração deste nutriente extremamente importante para o cultivo de microalgas.

Relativamente ao azoto, quando este é fornecido sob a forma de amónio, o aumento de pH do meio de cultura pode diminuir a concentração de azoto disponível para as microalgas (Guštin e Marinšek-Logar, 2011). Valores elevados de pH deslocam o equilíbrio químico do amónio no sentido da produção de amoníaco que pode ser libertado para a atmosfera devido ao arejamento da cultura, reduzindo desta forma a disponibilidade de azoto para as microalgas.

A concentração de fósforo no meio de cultura também pode ser influenciada por valores elevados de pH, uma vez que um meio de cultivo muito alcalino pode levar à precipitação do fosfato (sob as formas de fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio) e consequentemente limitar a quantidade de fósforo disponível para as microalgas (Wang e Nancollas, 2008).

Por fim, o pH pode afetar diretamente as microalgas, uma vez que o pH do citoplasma das microalgas é neutro, ou ligeiramente alcalino, e as suas enzimas são sensíveis ao pH, podendo ficar inativas em condições ácidas (Chiranjeevi e Mohan, 2016). Assim, condições extremas de pH podem provocar a ruptura de muitos processos celulares, os quais podem conduzir ao colapso da cultura (Jia et al., 2017).

Tripathi *et al.* (2015) estudaram o efeito do pH no crescimento da microalga *Scenedesmus sp* numa gama de 7 a 10, tendo concluído que o pH ótimo para esta espécie era 8. Munir *et al.* (2015) avaliaram o efeito do pH no crescimento de duas espécies de microalgas (*Spirogyra sp.* e *Oedogonium sp.*) numa gama de 6,5 a 9, tendo obtido como valor ótimo um pH de 7,5 para ambas as espécies.

Intensidade luminosa e temperatura

A energia luminosa recebida pelas microalgas é função da densidade de fluxo de fotões que atinge a superfície da cultura (Richmond, 2004). As células absorvem apenas uma fração do fluxo de fotões, fração essa que é influenciada por vários fatores, tais como: (i) a densidade celular, (ii) as propriedades óticas das células, (iii) o comprimento do trajeto ótico do fotobiorreator e (iv) a velocidade de mistura da cultura. Os fotões que não são absorvidos pelos centros de reação fotossintética das células dissipam-se principalmente sob a forma de calor ou podem ser refletidos, existindo assim uma forte interação entre a luz e a temperatura. Um aspeto elementar da interação da luz e da temperatura é o facto de a temperatura ótima para a fotossíntese aumentar com o aumento da intensidade luminosa. Goncalves *et al.* (2016) avaliaram o efeito da luz e da temperatura no crescimento de microalgas (*C. vulgaris*, *P. subcapitata*, *S. salina* e *M. aeruginosa*) e remoção de nutrientes. No caso da *C. vulgaris*, estes autores verificaram que a temperatura ótima de crescimento era 25 °C e a irradiância diária ótima era de $208 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

A Figura 2.1 apresenta a variação da taxa fotossintética com a intensidade luminosa. Com o aumento da intensidade da luz, a taxa fotossintética pode atingir um valor correspondente à saturação (Richmond, 2004). Um aumento adicional na intensidade da luz acima deste valor não irá resultar num aumento adicional na taxa de crescimento, podendo tornar-se prejudicial,

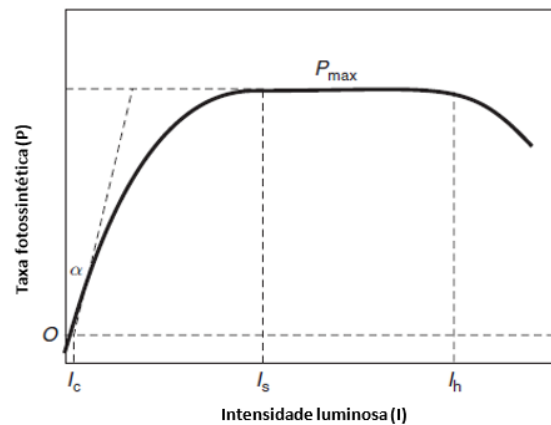


Figura 2.1 - Curva de resposta da fotossíntese à luz (adaptado de Richmond (2004)).

manifestando-se inicialmente por uma diminuição na taxa de crescimento e culminando em fotoinibição e/ou, em casos extremos, na morte de cultura.

2.1.4 Tecnologias de cultivo de microalgas

Atualmente, as tecnologias utilizadas para o cultivo de microalgas podem ser de dois tipos: sistemas abertos (*raceway ponds*, lagoas, entre outros) e sistemas fechados/fotobiorreatores (tubular, reator de placas vertical ou horizontal, cilíndrico, coluna de bolhas, tanques agitados e *airlift*) (Dasgupta *et al.*, 2010; Kochen, 2010).

Sistemas abertos

Os sistemas *raceway ponds* são constituídos por um canal de recirculação em circuito fechado, normalmente com 0,3 m de profundidade (Benemann e Oswald, 1996; Craggs *et al.*, 2012). A mistura e a circulação são produzidas por uma roda de pás e o fluxo é guiado nas curvas por defletores colocados no canal de fluxo, tal como representado na Figura 2.2. Durante o dia, a cultura é alimentada continuamente na frente da roda de pás, onde o escoamento se inicia (Chisti, 2007). A roda de pás funciona continuamente, de modo a prevenir a sedimentação da biomassa.

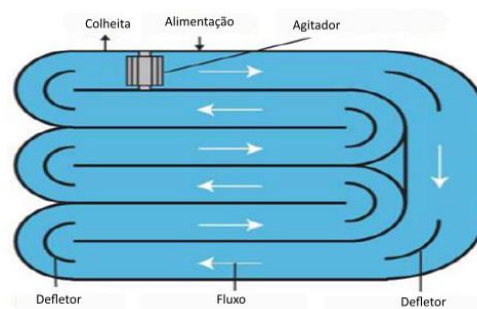


Figura 2.2 – Sistema de cultivo em circuito (*raceway*) (adaptado de Walter (2011)).

Nos sistemas abertos, o arrefecimento é conseguido apenas por evaporação (Chisti, 2007). A temperatura varia sazonalmente e ao longo do dia, podendo resultar em perdas significativas de água por evaporação. Por ser um sistema aberto, a utilização de CO₂ é menos eficiente nestes sistemas do que nos sistemas fechados (devido às perdas deste composto para a atmosfera), representando também um custo significativo na produção de microalgas. Para além disso, os sistemas abertos são mais suscetíveis a contaminações de outras algas ou microrganismos que se alimentam de algas. Além de ocuparem grandes áreas e não poderem operar por longos períodos de tempo (devido a problemas de contaminação), estes sistemas apresentam baixa produtividade devido ao facto da mistura ser pouco eficiente e não conseguirem evitar a existência de zonas óticamente escuras. Contudo, as lagoas *raceway* apresentam um menor custo de produção, quando comparadas com os fotobiorreatores, uma vez que apresentam menores custos de investimento e operação (Chisti, 2007; Harun *et al.*, 2010; Pushparaj *et al.*, 1997). Para além disso, as lagoas *raceway* têm a vantagem de ser facilmente limpas (remoção de biofilme acumulado nas paredes dos canais) (Chisti, 2007).

Sistemas fechados

Ao contrário dos sistemas abertos, os fotobiorreatores permitem a cultura de uma única espécie de microalgas para longos períodos de cultivo (Molina Grima *et al.*, 1999). De entre os vários tipos de fotobiorreatores existentes para o cultivo de monoculturas de microalgas, os fotobiorreatores tubulares são os mais adequados para a produção em larga escala de microalgas.

Os fotobiorreatores tubulares são constituídos por um conjunto de tubos transparentes, geralmente de plástico ou vidro (Chisti, 2007). Os tubos apresentam normalmente um diâmetro inferior ou igual a 0,1 m. O diâmetro do tubo é limitado, por forma a permitir a penetração da luz no interior do tubo, garantido assim a disponibilidade de luz para toda a cultura. A cultura circula no interior dos tubos, passando posteriormente por um reservatório (coluna de degaseificação) e regressa novamente aos tubos, tal como demonstrado na Figura 2.3. Existem outras variantes de fotobiorreatores, no entanto não são muito utilizados (Carvalho *et al.*, 2006; Molina Grima *et al.*, 1999; Pulz, 2001; Tredici, 2002).

Algumas das vantagens dos fotobiorreatores são a facilidade de controlo das condições de cultivo (pH, agitação, concentração de CO₂ e oxigénio – O₂), a redução das perdas por evaporação e de CO₂, a possibilidade de operar com concentrações celulares e produtividades volumétricas elevadas e, por fim, a redução das contaminações por outros microrganismos (Li *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010).

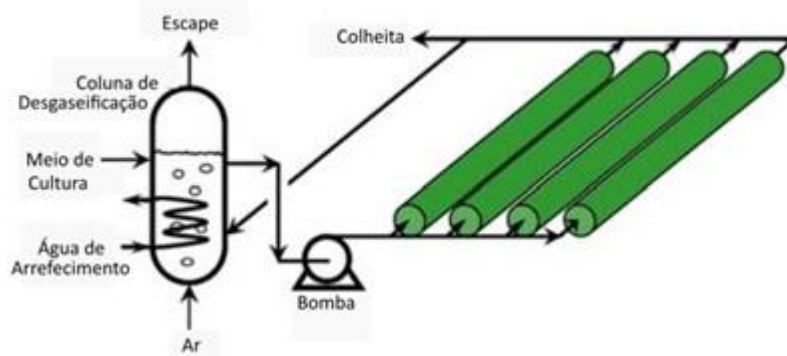


Figura 2.3 - Fotobiorreator tubular com tubos paralelos e horizontais (adaptado de Chisti (2007)).

Contudo, os fotobiorreatores possuem algumas desvantagens, entre elas o sobreaquecimento da cultura, a acumulação de O_2 e os elevados custos de construção.

2.1.5 Aplicações das microalgas

A biomassa das microalgas pode ser utilizada para gerar produtos de valor acrescentado. A aplicabilidade da biomassa das microalgas varia consoante a espécie utilizada (Spolaore *et al.*, 2006). Atualmente, existem numerosas aplicações comerciais para microalgas, tais como: (i) utilização das microalgas para aumentar o valor nutritivo dos alimentos e das rações para animais devido à sua composição química; (ii) incorporação em produtos cosméticos; (iii) produção de biocombustíveis; (iv) captura de CO_2 e (v) tratamento de águas residuais.

Gouveia e Empis (2003) concluíram que a biomassa da *C. vulgaris* e da *Haematococcus pluvialis* era uma fonte natural e relativamente concentrada de carotenoides, que são pigmentos naturais que apresentam capacidade antioxidante. Os principais carotenoides, presentes nas microalgas, com interesse comercial são o β -caroteno, a luteína e a astaxantina (Mostafa, 2012). Para além destes compostos, as microalgas podem ser usadas para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos: proteínas, cosméticos, produtos farmacêuticos, entre outros.

No contexto de aplicações ambientais, as microalgas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes em ETARs (Hoffmann, 1998; Oswald, 2003). A descarga de águas residuais com elevadas quantidades de N e P pode provocar, a jusante, graves problemas de eutrofização dos cursos de água (Correll, 1998). Assim, a remoção de N e P à base de microalgas pode ser bastante eficiente, mais barata e ecologicamente mais segura do que os tratamentos físicos e químicos atualmente utilizados (Hoffmann, 1998).

As microalgas podem ainda ser utilizadas na biofixação de CO₂ atmosférico (ou de efluentes gasosos industriais) através da fotossíntese, contribuindo para a diminuição da concentração deste importante gás com efeito de estufa (Nascimento *et al.*, 2015; Sheehan *et al.*, 1998). As microalgas conseguem capturar cerca de 1,7 a 2,4 toneladas de CO₂ por tonelada de biomassa.

2.2 Tratamentos presentes numa ETAR

O tratamento de águas residuais pode envolver processos físicos, químicos e biológicos ou uma combinação destes processos, dependendo do tipo de água residual a tratar (doméstica e/ou industrial) e da qualidade da água exigida no final do tratamento (EPA, 1997). As ETARs destinadas ao tratamento de águas residuais urbanas podem ter cinco etapas principais de tratamento: tratamento preliminar, primário, secundário, terciário e desinfecção.

2.2.1 Tratamento preliminar

As águas residuais domésticas contêm inevitavelmente elevadas quantidades de sólidos não solúveis em formas suspensas, decantáveis e flutuantes, que podem ser de material orgânico ou inorgânico, tal como papel, plástico, vegetação, gorduras e areia (Cheng, 2015). Embora não possuam elevada carga poluente, estes sólidos podem causar, nas etapas de tratamento a jusante, muitos problemas, incluindo: (i) entupimento das condutas; (ii) danificação ou desgaste anormal de bombas; (iii) redução da área de passagem da água; e (iv) libertação de maus odores. Assim, nesta etapa, os sólidos de maiores dimensões são separados das águas residuais através de processos como a gradagem grossa, tamisagem fina e processos de desarenação e desengorduramento.

Além do tratamento para remoção dos sólidos acima mencionados, o tratamento preliminar/obra de entrada de uma ETAR inclui frequentemente instalações que não apresentam funções de tratamento (Cheng, 2015). Alguns exemplos são o desvio de caudal em excesso, medição de caudal afluente e estações elevatórias de efluente pré-tratado.

2.2.2 Tratamento primário

O tratamento secundário é normalmente precedido por uma unidade de tratamento usualmente designada por sedimentação primária/decantador primário (Abdel-Raouf *et al.*, 2012; EPA, 1997). Os decantadores primários são geralmente circulares ou retangulares e têm como função reduzir a velocidade do efluente, de modo a permitir a sedimentação dos sólidos sedimentáveis. Tipicamente, entre 50% e 70% dos sólidos sedimentáveis das águas residuais são

removidos nos decantadores primários. Para além disso, a carência bioquímica de oxigénio (CBO) é reduzida entre 20% e 50%.

2.2.3 Tratamento secundário

O tratamento secundário/tratamento de lamas ativadas consiste na estabilização da matéria orgânica, presente nas águas residuais, através de microrganismos aeróbios, num tanque arejado (EPA, 1997). Dependendo do tipo de reator presente nas ETARs, os microrganismos podem estar em suspensão ou fixos a suportes naturais ou artificiais onde formam camadas de biofilme. Atualmente, o tratamento biológico mais utilizado consiste num tanque arejado com a biomassa em suspensão (tratamento de lamas ativas).

Tal como representado na Figura 2.4, o efluente é introduzido num tanque arejado que contém microrganismos (bactérias, fungos, leveduras e protozoários), os quais são designados por lamas ativadas ou licor misto (Abdel-Raouf et al., 2012; EPA, 1997). O arejamento do tanque pode ser feito através de difusores submersos, agitadores mecânicos superficiais ou uma combinação dos dois. O arejamento tem como função: homogeneizar o efluente, manter as lamas ativadas em suspensão e introduzir o oxigénio necessário para os microrganismos. Após o tempo de contacto entre a água residual e as lamas ativadas, estas são separadas do efluente através dos decantadores secundários. Por forma a manter uma concentração microbiana adequada no tanque arejado, parte das lamas decantadas é recirculada para o tanque. As lamas em excesso, resultantes do crescimento biológico, são periodicamente ou continuamente removidas (purga de lamas).

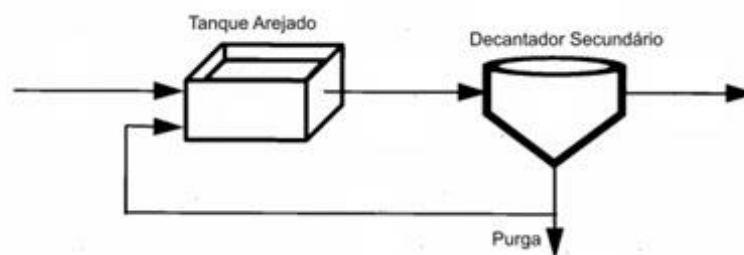


Figura 2.4 - Tratamento de lamas ativadas (adaptado de EPA (1997)).

2.2.4 Tratamento terciário

O tratamento terciário tem como objetivo reduzir ainda mais os valores de alguns parâmetros, por forma a cumprir os valores limites de emissão (VLE) (EPA, 1997). Esta etapa de tratamento envolve a redução das concentrações de fósforo e azoto da água residual, de modo a evitar a eutrofização dos corpos de água. No tratamento secundário, a remoção de fósforo e azoto é relativamente baixa, devido à elevada concentração destes nutrientes no efluente.

Remoção de azoto

O azoto pode ser removido das águas residuais através de processos físico-químicos ou biológicos (EPA, 1997). Os processos físico-químicos (*air stripping* e permuta iónica) não são muito utilizados, uma vez que originam maior quantidade de lamas, apresentam um custo superior e produzem um efluente de menor qualidade, em comparação com os processos biológicos.

Tal como demonstrado na Figura 2.5 e 2.6, os processos para a remoção biológica de azoto podem ser incorporados ou adaptados no tratamento secundário. A remoção de azoto é feita em duas etapas: nitrificação e desnitrificação (EPA, 1997). O processo de nitrificação consiste na oxidação do amónio para nitrito (bactéria *nitrosomonas*) e na oxidação do nitrito para nitrato (*nitrobacter*). Por outro lado a desnitrificação reduz, sequencialmente, o nitrato a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso (N_2O) e azoto (bactérias desnitrificantes). O processo de nitrificação é uma etapa aeróbia, ou seja pode decorrer no tanque de tratamento biológico, ao passo que o processo de desnitrificação é um processo anóxico, podendo ocorrer num tanque de tratamento biológico adaptado para possuir uma zona anóxica ou num tanque exclusivamente anóxico (antes ou após o tratamento biológico).

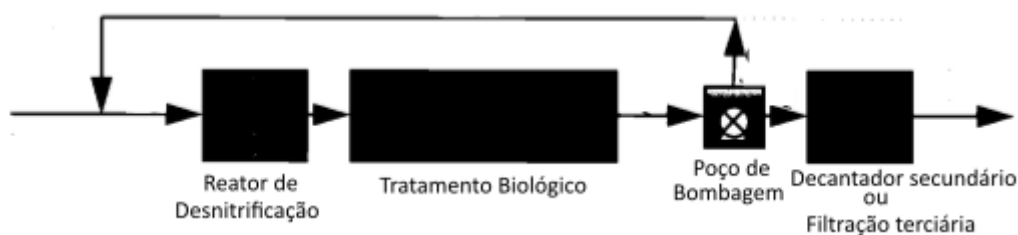


Figura 2.5 - Pré-desnitrificação biológica (adaptado de EPA (1997)).

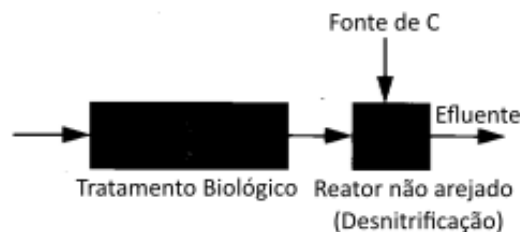


Figura 2.6 - Pós-desnitrificação biológica (adaptado de EPA (1997)).

Remoção de fósforo

O fósforo presente nas águas residuais pode ser removido através de processos químicos ou biológicos (EPA, 1997). Nas águas residuais, o fósforo pode estar presente na forma de orto-fosfato, polifosfato e fosfato orgânico. Durante o tratamento aeróbio, o polifosfato e o fosfato orgânico são convertidos em orto-fosfato que precipita facilmente através da adição de

produtos químicos. Na precipitação do fósforo, sais metálicos são geralmente utilizados, sendo que o sulfato férrico, o cloreto férrico, ferro ferroso e alumínio são os mais adequados. Tal como demonstrado na Figura 2.7, a adição dos sais metálicos pode ser feita em diferentes pontos do tratamento: antes da sedimentação primária, na etapa de tratamento biológico e antes da sedimentação secundária.

A remoção biológica de fósforo depende principalmente da capacidade da bactéria *Acinetobacter spp.* para libertar o fosfato, sob condições anaeróbias, e absorve-lo, sob condições aeróbias (EPA, 1997). Para que a remoção de fósforo seja realizada com sucesso, algumas condições devem ser garantidas, tais como:

- Oxigénio dissolvido e nitratos devem ser excluídos da zona anaeróbia;
- O decantador secundário deve conter oxigénio dissolvido suficiente para manter a lamas decantadas aeróbias, de modo a evitar a libertação de fósforo para a fase líquida e, conseqüentemente, para o efluente final;
- Como o fósforo está contido na fração sólida, é necessário uma boa sedimentação dos sólidos no decantador secundário.

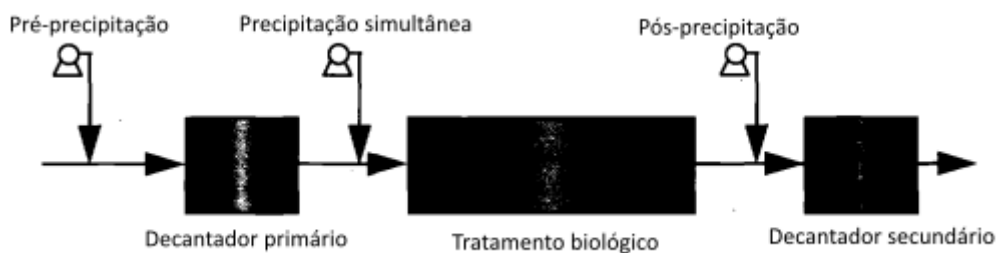


Figura 2.7 - Pontos de dosagem para a precipitação química do fósforo (adaptado de EPA (1997)).

2.2.5 Desinfecção

De modo evitar a propagação de doenças transmitidas pela água e também para minimizar problemas de saúde pública, é necessário destruir os organismos patogénicos presentes nas águas residuais (Abdel-Raouf et al., 2012). Embora a maioria desses microorganismos não sejam agentes patogénicos, estes devem ser considerados como potencialmente presentes. Assim, antes da descarga do efluente no meio recetor hídrico, este é sujeito à última etapa de tratamento: desinfecção. A desinfecção consiste na destruição de todos os agentes patogénicos presentes nas águas residuais. Nas ETARs destinadas ao tratamento de águas residuais urbanas, a desinfecção ocorre geralmente através de radiação UV.

2.3 Microalgas na depuração de águas residuais

As microalgas podem desempenhar um papel importante no tratamento das águas residuais, nomeadamente ao nível da remoção de nutrientes e da redução dos custos de operação das ETARs.

2.3.1 Remoção de nutrientes

As águas residuais urbanas são ricas em carbono, azoto, fósforo e outros minerais, os quais têm de ser removidos antes da descarga do efluente nos corpos de água (Cabanelas *et al.*, 2013). Um excesso de carbono orgânico e de nutrientes em rios e lagos pode conduzir à diminuição do oxigénio dissolvido, à toxicidade da vida aquática e à eutrofização.

Em sistemas aquáticos naturais, as microalgas assimilam grandes quantidades de nutrientes e metais em quantidades residuais durante o seu crescimento. As microalgas conseguem digerir fontes inorgânicas de azoto, tais como nitrato, nitrito e amónio (Jia *et al.*, 2017).

A utilização das microalgas no tratamento de águas residuais foi inicialmente proposta por Oswald e Gotass (1957) e nas últimas décadas tem recebido muita atenção. A premissa desta abordagem é que os sistemas mixotróficos podem ser projetados para reduzir o carbono orgânico, bem como os nutrientes nas águas residuais urbanas para os valores de descarga legislados (McCarty *et al.*, 2011). As microalgas apresentam-se com uma ótima solução para o tratamento terciário devido ao facto de necessitarem de elevadas quantidades de azoto e o fósforo para o seu crescimento, nomeadamente para a síntese de proteínas (40-60% em peso seco), ácidos nucleicos e síntese fosfolipídica (Silva-Benavides e Torzillo, 2011). O tratamento de águas residuais à base de microalgas pode remover N e P de forma mais eficiente que o tradicional tratamento de lamas ativadas (Lau *et al.*, 1995; Lavoie e de la Noüe, 1983; Tam e Wong, 1989). Para além da remoção destes nutrientes, as microalgas têm ainda a capacidade de remover metais pesados das águas residuais (Rai *et al.*, 1981). Por fim, as microalgas exercem ainda um efeito desinfetante no efluente devido ao aumento de pH inerente à fotossíntese (de la Noue e de Pauw, 1988). As vantagens acima referidas fazem deste sistema uma excelente alternativa para o tratamento tradicional de águas residuais.

As eficiências de remoção de nutrientes dependem da composição da água residual e das condições ambientais, tais como a concentração inicial de nutrientes, a intensidade luminosa, a razão N:P, o ciclo luz/escuro e as espécies de microalgas (Aslan e Kapdan, 2006). As espécies de microalgas mais estudadas para o tratamento de águas residuais domésticas são a *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas* e *Spirulina* (Chinnasamy *et al.*, 2010;

Kong *et al.*, 2010; Olguín, 2003; Wang *et al.*, 2010). Tendo em conta o potencial das microalgas para o tratamento de águas residuais, a Tabela 2.1 apresenta vários estudos que demonstram a viabilidade de culturas de microalgas em diferentes tipos de águas residuais na remoção de nutrientes.

Tabela 2.1 - Remoção de nutrientes das águas residuais com culturas de microalgas em suspensão.

Microalga	Condições operatórias	Remoção (%)			Ref.
		$[N - NH_4^+]_i$ (mg L ⁻¹)	$[N - NO_3^-]_i$ (mg L ⁻¹)	$[PT]_i$ (mg L ⁻¹)	
<i>Botryococcus braunii</i>	Fermentador BioFlo; V = 9 L; T = 25 °C; IL = 3500 lx; CLE = 12:12; TC = 14 d.		79,63	100	(Sydney <i>et al.</i> , 2011)
Doméstica			390	385 [P-PO ₄ ³⁻]	
<i>C. vulgaris</i>	Biorreator de colunas; V = 2 L; T = 30 °C; IL = 3000 lx; TC = 14 d.	97		96	(Feng <i>et al.</i> , 2011)
Sintética		20		4	
<i>Chlorella sp.</i>	Biorreator em serpentina; V = 25 L; T = 25±2 °C; IL = 50 µmol m ⁻² s ⁻¹ ; TC = 14 d.	93,9		80,9	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Municipal		82,5		212	
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Biorreator cilíndrico; V = 400 mL; T = 30 °C; IL = 1280 lm; TC = 7 d.		99	100	(Wang e Lan, 2011)
Sintética			140	47	

CLE – Ciclo luz/escuro; IL – Intensidade Luminosa; T – Temperatura; TC – Tempo de cultivo; V – Volume.

2.3.2 Limitações dos tratamentos convencionais

Os microrganismos presentes nas lamas ativadas requerem fósforo para o seu crescimento, o que resulta na remoção parcial de fosfato durante o tratamento secundário (Cheng, 2016). No entanto, esta remoção não é significativa. Assim, de modo a ser possível alcançar o VLE de 2 mg·P·L⁻¹, presente no Decreto-lei n.º 348/98 para zonas com 10 000 a 100 000 habitantes equivalentes, é necessário recorrer à utilização de coagulantes inorgânicos, tais como cal, sulfato de alumínio e cloreto de ferro. Para além de acarretar custos para o processo, a adição destes coagulantes é menos ambientalmente sustentável que a remoção de fósforo pelas microalgas.

Uma outra limitação prende-se com o principal subproduto gerado no tratamento biológico: resíduos das lamas ativadas. Para tratar 1 milhão de litros de água residual, o tratamento biológico produz cerca de 70 – 100 kg de resíduos de lamas biológicas em base seca (Athanasoulia *et al.*, 2012). Consequentemente, o tratamento e a deposição destes resíduos implica uma área de deposição considerável e um gasto de energia elevado. Para além disto, o arejamento mecânico (necessário no tratamento biológico) pode provocar a libertação de

contaminantes voláteis para a atmosfera (Jia et al., 2017). O papel das microalgas nesta etapa poderia reduzir ou até mesmo evitar a libertação desses contaminantes, uma vez que as microalgas iriam produzir oxigénio e, assim, reduzir a necessidade de arejamento.

Por fim, as ETARs emitem diretamente para a atmosfera gases com efeito de estufa, tais como N_2O e CO_2 provenientes do tratamento biológico (Campos *et al.*, 2016). Os tratamentos convencionais não têm capacidade para proceder à biofixação/captura do CO_2 e, assim, evitar a libertação do mesmo para a atmosfera. A opção mais eficiente, em termos de custos, para reduzir as emissões de gases com efeito de estufa passa provavelmente pela modificação das condições operacionais das ETARs. No entanto, isto nem sempre é possível devido às limitações operacionais das unidades instaladas.

2.3.3 Benefícios das microalgas nas ETARs

No tratamento de lamas ativadas, estima-se que a remoção de 1 kg de CBO consome cerca de 1 kW·h de eletricidade para arejamento (o que implica a emissão 1 kg de CO_2 na produção de eletricidade) e produz cerca de 0,45 kg de resíduos de biomassa (Oswald, 2003). Em contrapartida, a remoção de 1 kg de CBO pelas microalgas (via fotossintética), em sistemas mixotróficos, não requer entrada de energia e pode produzir biomassa suficiente para gerar metano que posteriormente produzirá 1 kW·h de energia elétrica. O tratamento de águas residuais à base de microalgas é um processo ecológico, sem poluição secundária, e que permite uma reciclagem eficiente dos nutrientes (Mulbry et al., 2008; Muñoz e Guieysse, 2006; Pizarro et al., 2006).

A biomassa das microalgas resultante dos sistemas de tratamento de águas residuais pode dar origem a produtos com interesse comercial, tais como fertilizantes, produtos químicos finos, biocombustíveis, entre outros, reduzindo, assim, os custos totais da estação de tratamento (de la Noüe et al., 1992).

Por fim, a biofixação de CO_2 pelas microalgas é um método ambientalmente amigável para remover carbono da atmosfera (Singh e Yadav, 2015). As microalgas foram descritas como tendo elevada capacidade para fixar CO_2 , quando comparadas com as plantas terrestres (Chen et al., 2013). Neste sentido, as microalgas podem fixar o CO_2 libertado pelas lamas ativadas, evitando a sua libertação para a atmosfera.

Resumindo, o interesse nas culturas de microalgas decorre do facto dos processos de tratamento convencionais sofrerem de algumas desvantagens importantes, tais como: (i) eficiência variável dependendo do nutriente a ser removido; (ii) tratamento dispendioso; (iii)

processos químicos conduzem a poluição secundária; e (iv) perda de nutrientes com possível valor (N e P) (de la Noüe *et al.*, 1992).

Assim, o aumento do aquecimento global, a escassez dos combustíveis fósseis e a necessidade de mitigar as emissões de gases com efeito de estufa, fazem com que o estudo da viabilidade do tratamento biológico de águas residuais à base de microalgas (associadas à produção de biocombustíveis) seja de extrema importância (Rawat *et al.*, 2011).

2.3.4 Redução dos custos de operação

A introdução das microalgas nos processos de tratamento de águas residuais pode reduzir alguns dos custos associados, tais como obtenção de biomassa residual de valor superior, redução dos custos de arejamento e redução da utilização de coagulantes (Christenson e Sims, 2011). Comparativamente aos processos de tratamento físico e químico, o tratamento à base de microalgas pode conseguir a remoção de nutrientes de forma menos dispendiosa e mais segura do ponto de vista ecológico, com os benefícios adicionais de recuperação e reciclagem de recursos. O tratamento mais comum para a remoção de azoto (nitrificação/desnitrificação bacteriana) remove a maioria do azoto sob a forma de azoto gasoso (N₂), enquanto o tratamento com microalgas retém os compostos azotados na biomassa, acrescentando-lhe valor.

O arejamento via fotossintética é especialmente interessante, uma vez que permite reduzir os custos de operação associados ao arejamento do tratamento biológico (Borowitzka e Borowitzka, 1988). O custo relativo do tratamento de água residual duplica a cada etapa após o tratamento primário. O arejamento mecânico representa mais de 50% das necessidades energéticas das ETARs (EPA Office of Water, 2006). Recentemente, estudos têm demonstrado que as microalgas podem, de facto, suportar a degradação aeróbia de vários contaminantes perigosos (Muñoz e Guieysse, 2006; Safonova *et al.*, 2004).

Tal como referido anteriormente, de forma a ser possível atingir o VLE de 2 mg·P·L⁻¹, para zonas com 10 000 a 100 000 habitantes equivalentes, é necessário recorrer à adição de coagulantes inorgânicos. Neste sentido, as microalgas desempenhariam um papel fundamental, uma vez que reduziam a aplicação destes coagulantes e evitariam um foco de poluição secundária.

2.4 Limitações das microalgas no tratamento de águas residuais

Como todos os sistemas de tratamento, as microalgas também apresentam algumas desvantagens/limitações no tratamento de águas residuais.

2.4.1 Variabilidade da temperatura

A produtividade das microalgas aumenta com o aumento da temperatura até um valor ótimo, acima do qual a respiração e a fotorrespiração das microalgas reduzem a produtividade global (Park *et al.*, 2011). Deste modo, temperaturas demasiado elevadas ou demasiado baixas podem ter um efeito negativo sobre o crescimento das microalgas e, conseqüentemente, podem causar inibição do crescimento. A temperatura ideal, medida sob condições máximas de crescimento (condições adequadas de nutrientes e de luz), varia de espécie para espécie, contudo, para muitas das espécies, situa-se entre os 28 e os 35 °C. No entanto, a temperatura ótima varia quando as condições de nutrientes e/ou de luz são limitantes e o crescimento diminui quando as microalgas são sujeitas a mudanças súbitas de temperatura (Larsdotter, 2006). Por exemplo, a exposição de uma espécie a uma temperatura de 10 °C, quando esta estava adaptada a valores superiores, resultou numa redução de cerca de 50% da clorofila *a* em apenas 15 h. Além disso, uma intensidade luminosa elevada associada a baixas temperaturas é também outro fator que provoca inibição do crescimento.

Tendo em conta a variabilidade da temperatura ao longo do dia e do ano, é espectável que a eficiência do tratamento de águas residuais à base de microalgas seja afetada. Neste sentido, a variabilidade sazonal da temperatura é uma das principais limitações à introdução das microalgas nas ETARs, uma vez que será difícil manter as culturas dentro de uma gama de temperaturas aceitáveis durante todo o ano.

2.4.2 Ciclo luz/escuro

A qualidade, intensidade e duração do período de luz são parâmetros extremamente importantes na produção de microalgas (Cardinale, 2011). Em sistemas de cultivo *outdoor*, a radiação solar é a única fonte de luz e a disponibilidade da mesma é, portanto, dependente da localização geográfica, do clima e da sazonalidade (Novoveská *et al.*, 2016). Os regimes de luz (aos quais as culturas são submetidas) são considerados um fator importante na produtividade e rendimento das reações fotossintéticas (Sicko-Goad e Andresen, 1991; Toro, 1989).

Lee e Lee (2001) avaliaram o efeito do ciclo luz/escuro no tratamento de águas residuais pela microalga *Chlorella kessleri*. Este estudo revelou que, ao fim de 3 d, a quantidade de nitrato removida era de 31,6 mg NO₃⁻·L⁻¹, sob condições de luz contínua, e de 14,0 mg NO₃⁻·L⁻¹, para o ciclo luz/escuro de 12:12. No entanto, a remoção de carbono orgânico e fosfato foi superior na cultura sob condições de luz/escuro 12:12. Neste sentido, *C. kessleri* poderia crescer quimioheterotroficamente durante os períodos escuros, uma vez que as microalgas conseguem metabolizar o carbono orgânico para o seu crescimento sem fotossíntese. No que diz respeito à

espécie em estudo (*C. vulgaris*), Santos *et al.* (2011) estudaram o efeito de dois ciclos luz/escuro: 24:0 e 12:12. Este estudo demonstrou que o ciclo de luminosidade contínua apresentou uma taxa de crescimento superior.

Em suma, dependendo do tipo de efluente a tratar (primário, secundário ou terciário), o ciclo luz/escuro poderá ter diferentes impactos na eficiência do tratamento, uma vez que o efluente primário e secundário têm elevadas concentrações de carbono orgânico. Em contrapartida, o efluente terciário possui baixas quantidades de carbono orgânico, o que poderá limitar o crescimento quimioheterotrófico das microalgas e, consequentemente, a eficiência do tratamento.

2.4.3 Competição com a microflora presente nas águas residuais

A coexistência de microalgas e bactérias no mesmo meio consiste num processo biológico que ocorre pela interação de dois processos distintos: fotossíntese das microalgas e respiração bacteriana (Anbalagan, 2016). Estes dois processos ocorrem simultaneamente nas águas residuais com troca de nutrientes, tal como representado na Figura 2.8.

Sforza *et al.* (2014) avaliaram o efeito da microflora nativa das águas residuais no crescimento da microalga *C. protothecoides*. Os resultados obtidos indicaram que não foram detetadas diferenças significativas no crescimento da microalga, sugerindo que a presença da microflora nativa nas águas residuais não influencia o crescimento das microalgas.

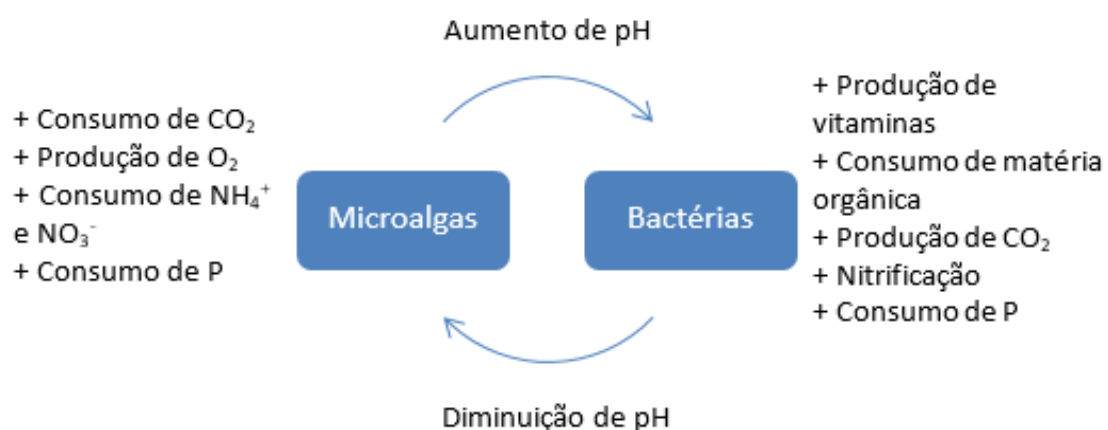


Figura 2.8 - Visão geral do processo de troca de nutrientes microalgas-bactérias em águas residuais (adaptado de Anbalagan (2016)).

2.4.4 Colheita da biomassa

Apesar das inúmeras vantagens da biorremediação das águas residuais pelas microalgas, existem, ainda, alguns obstáculos que limitam a sua aplicação em larga escala, tais como a

colheita da biomassa. Atualmente, o processo de colheita da biomassa é bastante dispendioso, uma vez que este processo representa cerca de 20 - 30% dos custos de produção de biomassa (Molina Grima *et al.*, 2003). A separação das microalgas do efluente continua a ser o principal obstáculo para a biorremediação de águas residuais em ETARs, em parte devido ao pequeno tamanho das microalgas. O tamanho das microalgas eucarióticas unicelulares varia, normalmente, entre 3 - 30 μm (Molina Grima *et al.*, 2003) e o tamanho das cianobactérias varia entre 0,2 - 2 μm (Chorus e Bartram, 1999). Para além do tamanho das partículas, o facto de as culturas serem relativamente diluídas (200-600 mg L^{-1}) (Uduman *et al.*, 2010) com densidades próximas à da água afeta também o processo de colheita. Por fim, o facto de a superfície das microalgas estar carregada negativamente faz com que as células se mantenham em suspensão, devido ao efeito de repulsão (Danquah *et al.*, 2009a). Neste momento, não existe um método de colheita de microalgas que seja economicamente viável e eficiente (Barros *et al.*, 2015). As técnicas de colheita de biomassa aplicadas às microalgas incluem a coagulação/floculação química, auto e biofloculação, sedimentação gravítica, flotação, processos elétricos, filtração e centrifugação. Contudo, nenhuma destas técnicas reúne as condições ideais para serem utilizadas em larga escala (custo vs eficiência) (Christenson e Sims, 2011). A redução dos custos de colheita é portanto considerada um fator-chave para o desenvolvimento de uma produção sustentável em grande escala de biomassa das microalgas. Um processo de colheita ideal deve ser eficaz para a maioria das estirpes de microalgas e deve permitir a obtenção de elevadas concentrações de biomassa (Danquah *et al.*, 2009b). Além disso, o processo de colheita deve apresentar custos moderados de operação, energia e manutenção.

2.4.5 Qualidade da água residual

A quantidade e a qualidade da penetração da luz afetam o processo fotossintético dos organismos que utilizam a luz solar como fonte de energia (Butler *et al.*, 2017). Assim, sendo as microalgas organismos fotossintéticos, a cor das águas residuais, bem como a quantidade de partículas em suspensão devem ser fatores a ter em conta aquando do cultivo de microalgas em águas residuais (Yaakob e Fakir, 2011). As microalgas, quando cultivadas em águas residuais, podem sofrer com os efeitos de sombreamento (devido ao alto teor de partículas) impedido, assim, que as microalgas se mantenham à superfície e obtenham a luz necessária à fotossíntese. Para além disto, os próprios microrganismos contribuem para a turbidez da água, limitando ainda mais a profundidade de penetração da luz. Tendo em conta estas interferências na penetração da luz, a fotossíntese ocorre, de forma mais significativa, apenas nas zonas mais superficiais dos órgãos de tratamento (USEPA, 2011), influenciando a eficiência do tratamento.

Por forma a maximizar a penetração de luz, o aumento da turbulência é um fator importante, uma vez que, através de um regime turbulento, todas as células vão ser expostas à luz durante, pelo menos, um curto período de tempo, tornando possível uma elevada produtividade (Yaakob e Fakir, 2011). Além disso, profundidades reduzidas dos órgãos de tratamento também permitem que a luz possa penetrar até o fundo dos tanques.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meio de cultura e microrganismo

A microalga (*C. vulgaris*) objeto de estudo neste trabalho foi obtida a partir do *American Type Culture Collection* (ATCC) e inoculada em meio de cultura teste da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) (OCDE, 2011) modificado, com a seguinte composição ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): 119 KNO_3 ; 12 $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 18 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 15 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 KH_2PO_4 ; 0,08 $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,185 H_3BO_3 ; 0,415 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,003 ZnCl_2 ; 0,0015 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10^{-5} $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,007 $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 100 NaHCO_3 . Os inóculos foram preparados em condições *indoor* (em garrações de 5 L). Visto que o volume de inóculo é significativo relativamente ao volume da cultura no fotobiorreator tubular (40 L), as concentrações iniciais dos nutrientes da cultura apresentam desvios relativamente à composição pretendida do meio. As culturas foram inoculadas (sem recurso a técnicas assépticas) durante 5 ou 10 dias, partindo de uma concentração celular inicial entre os 0,19 - 0,37 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para todos os ensaios.

A medição diária de carbono inorgânico dissolvido (CID) na cultura permitiu aferir a necessidade de adicionar este elemento à cultura, de forma a não limitar o crescimento da microalga. Assim, em alguns ensaios foi adicionado NaHCO_3 às culturas de microalgas. A medição diária de pH teve como objetivo evitar a alteração do meio de cultura por precipitação de metais ou fósforo, devido a valores elevados de pH. A acidificação do meio de cultura foi realizada através da adição de H_2SO_4 .

3.2 Instalação experimental

As culturas foram inoculadas numa instalação piloto (Figura 3.1 e Figura A.1), localizada no terraço do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, constituída por CPCs ($4,16\text{ m}^2$) montados numa estrutura fixa (latitude local 41°). Esta instalação possui dois tanques de armazenamento (55 e 100 L), duas bombas de recirculação ($20\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) e tubos de ligação. Os coletores solares são constituídos por quatro unidades de CPCs ($1,04\text{ m}^2$) com cinco tubos de borossilicato cada uma (*Schott-Duran type 3.3*, Alemanha, *cut-off* a 280 nm, diâmetro interno 46,4 mm, comprimento 1500 mm e espessura 1,8 mm) ligados por junções de plástico. Esta instalação pode ser operada de duas formas: (i) utilizar a área total dos CPCs ($4,16\text{ m}^2$) ou (ii) utilizar metade da área dos CPCs ($2,08\text{ m}^2$)



Figura 3.1 - Instalação experimental utilizada.

individualmente, permitindo assim realizar duas experiências independentes, em simultâneo, com as mesmas condições de radiação. Neste trabalho, a microalga *C. vulgaris* foi inoculada em duplicado na instalação piloto, isto é, foram utilizados $2,08 \text{ m}^2 + 2,08 \text{ m}^2$ de área dos CPCs, de modo a realizarem-se experiências em duplicado.

A microalga esteve apenas exposta à radiação solar, em média, cerca de 7 a 9 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$. Durante o restante tempo (cerca de 15 a 17 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$), a microalga permaneceu no interior dos tanques (opacos). Neste sentido, a intensidade luminosa variou ao longo do dia e de dia para dia. Ensaios preliminares demonstraram que a intensidade de radiação solar era nociva à cultura para baixas concentrações celulares. De forma a reduzir a intensidade de radiação que incide nas culturas, cobriu-se a instalação com uma rede sombra, diminuindo cerca de 71% da intensidade de radiação incidente (Figura A.2). Nos primeiros 3 ensaios, a rede sombra foi removida para um dos fotobiorreatores para analisar a influência do aumento da intensidade de radiação na cultura. A intensidade de radiação solar UV foi continuamente monitorizada por um radiómetro UV global (CUV 4, Kipp & Zonen, Holanda), com resposta espectral entre os 280 e os 400 nm, montado na instalação piloto, com a mesma inclinação.

A Tabela 3.1 apresenta as condições em que decorreram os cinco ensaios realizados.

Tabela 3.1 - Condições que foram realizados os diferentes ensaios.

Ensaio	FBR	Q_{med} (L·h ⁻¹)	$CPC_{descoberto}$ (h)	X_i (g·L ⁻¹)	I_{VIS} (W·m ⁻²)	I_{UV} (W·m ⁻²)	t_c (h)
I	1	1300	0	0,19	87	7	81
	2		15	0,20	162	10	
II	1	1300	22	0,33	232	15	44
	2		0	0,32	81	6	
III	1	780	44	0,30	356	20	44
	2		0	0,30	106	7	
IV	1	1300	0	0,37	79	5	73
	2		0	0,35	79	5	
V	1	1300	0	0,34	143	9	72
	2		0	0,32	143	9	

$CPC_{descoberto}$ – Tempo que o fotobiorreator esteve exposto a 100% da radiação incidente; FBR – Fotobiorreator; I_{UV} – Intensidade média de radiação UV; I_{VIS} – Intensidade média de radiação VIS; Q_{med} – Caudal médio; X_i – Concentração inicial de biomassa; t_c – tempo de cultivo.

3.3 Métodos de análise

Diariamente, todos os ensaios foram alvo de medições de temperatura, pH, densidade ótica, peso seco e radiação UV. A temperatura e o pH foram monitorizados diariamente com recurso a um medidor portátil (Tabela 3.2). Com base nas medições diárias de densidade ótica a 440 nm (DO_{440}) e peso seco (descrição do procedimento no Anexo A.3) foi possível obter uma reta de calibração que correlaciona estes dois parâmetros. A biomassa em peso seco (g·L⁻¹) em função da densidade ótica foi estimada com base na seguinte regressão linear: $X = (0,32 \pm 0,02) \times DO_{440} + (0,12 \pm 0,02)$ ($R^2=0,998$) para a espécie *C. vulgaris*.

O fluxo de fótons ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) da radiação visível (VIS) foi medido pontualmente para duas condições climáticas distintas (céu limpo e céu nublado), por forma a obter-se uma reta de calibração que correlaciona a intensidade de radiação UV (I_{UV} , W·m⁻²) com a intensidade de radiação VIS. Com base na constante de *Planck* e no comprimento de onda médio da radiação VIS ($\lambda = 575$ nm) foi possível determinar a intensidade de radiação VIS (I_{VIS} , W·m⁻²). As regressões lineares obtidas foram as seguintes: $I_{VIS} = (18,2 \pm 0,5) \times I_{UV} + (14 \pm 4)$ ($R^2 = 1,000$) para céu limpo e $I_{VIS} = (10,1 \pm 0,4) \times I_{UV} + (1 \pm 1)$ ($R^2 = 0,999$) para céu nublado.

A recolha de amostras, para análise de carbono orgânico dissolvido (COD) e cromatografia iónica, foi feita diariamente. Após a recolha, as amostras foram submetidas a uma centrifugação durante 15 min a uma velocidade de 4000 rpm. Após centrifugação, as amostras foram filtradas, através de filtros de seringa com membrana de nylon e porosidade 0,45 μm (Whatman, Reino Unido). A solução filtrada foi armazenada em tubos de falcon de 50 mL e guardada no

Tabela 3.2 - Equipamentos utilizados.

Parâmetro de análise	Modelo do equipamento	Marca	País
pH	8424	Hanna Instruments	Itália
Radiação VIS	HD 2102.2	Delta OHM	Itália
Radiação UV	CUV4	Kipp & Zonen	Holanda
Densidade ótica	Pharo 100	Merck	Alemanha
Cromatografia iónica	ICS-2100 (aniões) DX-120 (catiões)	Dionex	EUA
Carbono total/inorgânico	TOC-V _{CSN}	Shimadzu	Japão
Centrifugadora	Himac CT6E	VWR	EUA

frigorífico. No final de cada ensaio, as amostras foram retiradas do frigorífico e posteriormente submetidas às análises, à temperatura ambiente, para identificar os níveis de CID e COD. Para além dos níveis de carbono, as amostras foram também avaliadas em termos de composição iónica, por meio de cromatografia iónica. Através deste processo foi possível conhecer as concentrações dos nutrientes no meio de cultura.

A análise do CID e COD foi realizada num medidor TOC-V_{CSN} da Shimadzu, o qual recorre às técnicas de oxidação catalítica por combustão a 680 °C e deteção por infravermelho não-dispersivo (NDIR, do inglês *non-dispersive infrared*). Assim, para a determinação do carbono total dissolvido (CTD), um determinado volume de amostra foi sujeito a uma oxidação catalítica por combustão a 680 °C e todo o carbono (orgânico e inorgânico) foi convertido a CO₂. Posteriormente, o CO₂ foi detetado e quantificado por um detetor NDIR. Relativamente à determinação do CID, primeiramente ocorreu a acidificação da amostra com ácido clorídrico (HCl), o que permitiu que apenas a fração inorgânica do carbono fosse convertida a CO₂. À semelhança da determinação do CTD, também o CO₂ resultante da análise do CID foi detetado e quantificado através do detetor NDIR. Por fim, a concentração de COD foi determinada através da diferença entre a concentração do CTD e a concentração do CID das amostras filtradas.

Relativamente ao equipamento de cromatografia iónica, este possui as colunas AS9-HC/CS12A (4 mm × 250 mm) e os supressores ASRS®300/CSRS®300 (4 mm), para análise de aniões (F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, Br⁻ e PO₄³⁻) e catiões (Li⁺, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺), respetivamente. A determinação de aniões/catiões implica cerca de 12 minutos de leitura, com recurso a uma eluição isocrática com 30 mM NaOH/20 mM CH₃SO₂OH a um caudal de 1,5/1,0 mL·min⁻¹, respetivamente. Um dos objetivos deste trabalho prende-se com a avaliação da eficiência de remoção de azoto e fósforo inorgânico, pelo que foi necessário recorrer a este método de análise para determinar as suas concentrações. No entanto, para além destes dois

nutrientes, analisou-se, em alguns ensaios, a variação da concentração de cálcio, devido à possibilidade de este precipitar com o fosfato.

Os resultados gerados através da cromatografia iónica foram registados através de um programa informático designado por Chromeleon®, desenvolvido pela mesma empresa responsável pela comercialização do equipamento. Assim, a aquisição e conversão dos dados foi simplificada, uma vez que facilmente foi possível converter o sinal (condutividade) obtido para valores de concentração, recorrendo a retas de calibração previamente estabelecidas para cada espécie iónica.

3.4 Modelos cinéticos

Através dos valores de concentração da biomassa recolhidos durante o tempo de cultivo, e com base no tipo de modelos tipicamente adaptáveis ao crescimento de microrganismos em modo *batch*, foi possível determinar as taxas específicas de crescimento (μ , h^{-1}) (Wang *et al.*, 2014) e as produtividades de biomassa ($P_{x,med}$, $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). As taxas específicas de crescimento foram determinadas através da Equação 3.1:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \leftrightarrow \mu = \frac{\ln(X_i/X_0)}{t_i - t_0} \quad (3.1)$$

onde X_i corresponde à concentração da biomassa ($g \cdot L^{-1}$) no instante t_i e X_0 corresponde à concentração da biomassa no instante inicial t_0 do respetivo ensaio. Através da taxa específica de crescimento, foi possível identificar qual o ensaio que proporcionou as condições mais favoráveis ao crescimento da microalga em estudo, uma vez que quanto mais elevado o valor deste parâmetro, maior é o crescimento da microalga. O cálculo da taxa específica de crescimento restringe-se apenas à fase exponencial, uma vez que é nesta fase que o crescimento é mais significativo.

Relativamente à produtividade de biomassa, esta foi determinada através da diferença entre a concentração inicial e final (X_f , $g \cdot L^{-1}$) de biomassa por unidade de tempo (t_c , h) (Equação 3.2):

$$P_{x,med} = \frac{X_f - X_0}{t_c} \quad (3.2)$$

A partir dos resultados obtidos para as diferentes concentrações de nutrientes, foi possível determinar as eficiências de remoção (ER , %) e as taxas de remoção (TR , $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) no final de cada ensaio, respetivamente pelas Equações 3.3 e 3.4:

$$ER = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100 \quad (3.3)$$

$$TR = \frac{S_0 - S_f}{t_c} \quad (3.4)$$

onde S_0 e S_f correspondem à concentração inicial e final de um determinado nutriente ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), respetivamente.

Para além da ER e da TR , fez-se um ajuste do consumo de nutrientes com base num modelo cinético de pseudo-primeira ordem, sob o pressuposto de que a cinética de consumo em águas residuais é adaptável a este tipo de modelos (Wang *et al.*, 2014). Assim, a remoção de nutrientes em ordem ao tempo pode ser expressa pela Equação 3.5:

$$\frac{dS}{dt} = -kS \Leftrightarrow S_i = S_0 e^{-kt} \quad (3.5)$$

Através da linearização da Equação 3.5 obtém-se a Equação 3.6. Com base nesta última equação é possível obter o valor da constante cinética de remoção, através do declive da reta.

$$\ln\left(\frac{S_i}{S_0}\right) = -kt \quad (3.6)$$

A cinética de remoção de nutrientes foi determinada também em função da energia visível acumulada, através do mesmo modelo cinético de pseudo primeira ordem utilizado na determinação da cinética de remoção de nutrientes em função do tempo (Equação 3.5 e 3.6).

À semelhança da taxa específica de crescimento, também a constante cinética de remoção permite identificar o ensaio em que se obteve as taxas de remoção mais elevadas. Para que o crescimento celular ocorra terá que haver consumo de substratos e/ou nutrientes (fonte de carbono, azoto, etc.) que forneçam matéria-prima para a formação das novas células. Assim, os rendimentos específicos de biomassa ($Y_{X/S}$, $\text{g}_b\cdot\text{g}_s^{-1}$) podem ser determinados recorrendo à Equação 3.7.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3.7)$$

A Equação 3.8 permite obter a quantidade de energia visível acumulada ($Q_{VIS,i}$, $\text{kJ}\cdot\text{L}^{-1}$) recebida em qualquer superfície na mesma posição em relação ao sol, por unidade de volume de água dentro do reator, no intervalo de tempo Δt :

$$Q_{VIS,i} = Q_{VIS,i-1} + \Delta t_i \overline{VIS}_i \frac{A_r}{V}; \quad \Delta t_i = t_i - t_{i-1} \quad (3.8)$$

onde t_i é o tempo correspondente à amostra de água i , V é o volume total do reator, A_r é a área da superfície iluminada e \overline{VIS}_i é radiação visível média medida durante o período Δt_i .

Por fim, a partir da energia visível acumulada, foi possível determinar a eficiência fotossintética do fotobiorreator em estudo (Equação 3.9):

$$\eta = \frac{(X_{\max} - X_{\min}) \times PC}{Q_{\text{VIS}}} \times 100 \quad (3.9)$$

onde X_{\max} e X_{\min} correspondem à concentração máxima e mínima de biomassa da fase exponencial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), respetivamente. O poder calorífico da microalga *C. vulgaris* corresponde ao PC ($\text{kJ}\cdot\text{L}^{-1}$). Illman *et al.* (2000) estudaram o efeito da limitação de azoto no poder calorífico de diferentes microalgas (*genus Chlorella*). No caso da *C. vulgaris*, estes autores verificaram que o PC da microalga era de $18 \text{ kJ}\cdot\text{L}^{-1}$ em condições normais de cultivo, tendo sido este o valor utilizado na determinação da eficiência fotossintética.

Os modelos cinéticos foram determinados através do *software* OriginPro 8.5 (OriginLab, Northampton, MA). O cálculo da energia visível acumulada foi determinada a partir do *software* MS Excel, EUA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A discussão de resultados envolve a análise de 5 parâmetros: temperatura, carbono e pH, produção de biomassa, remoção de nutrientes e eficiência fotossintética.

4.1 Temperatura

De um modo geral, as temperaturas médias registadas em cada ensaio encontravam-se dentro da gama de valores considerados “toleráveis” para as espécies de microalgas mais comuns (Tabela 4.1): 16 a 27 °C (Lavens e Sorgeloos, 1996). Contudo, em todos ensaios registaram-se, pontualmente, valores de temperatura que ultrapassaram a gama de valores ótima. Deste modo, esta variação da temperatura poderá influenciar um crescimento uniforme das microalgas. Para além disto, a variabilidade da temperatura registada em cada ensaio poderá ser suficiente para causar interferências ao nível dos equilíbrios entre espécies iónicas.

Por forma a manter a temperatura dentro dos valores ótimos foi necessário recorrer, simultaneamente, a um banho termostático e ao arrefecimento dos tubos de borossilicato, através da aspersão de água. Em casos extremos foi ainda necessário recorrer à utilização de garrafões com gelo colocados nos interiores dos tanques. Assim, um eventual *scale-up* poderá acarretar alguns custos, uma vez que o controlo da temperatura é determinante para o bom desempenho das microalgas.

Tabela 4.1 - Temperaturas registadas nos ensaios

Ensaio	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	T _{med} (°C)
I	10,6	37,9	26,2
II	17,5	33,1	26,5
III	18,0	34,4	25,6
IV	13,8	35,5	24,8
V	17,2	41,1	27,7

T – Temperatura.

4.2 Carbono e pH

Neste trabalho pretendia-se estimular a via fotoautotrófica das microalgas, pelo que a única fonte de carbono adicionada ao meio de cultura foi inorgânica: NaHCO₃. A variação da concentração de carbono inorgânico nos fobiorreatores 1 (FBR1) e 2 (FBR2) está representada na Figura 4.1 A e B, respetivamente.

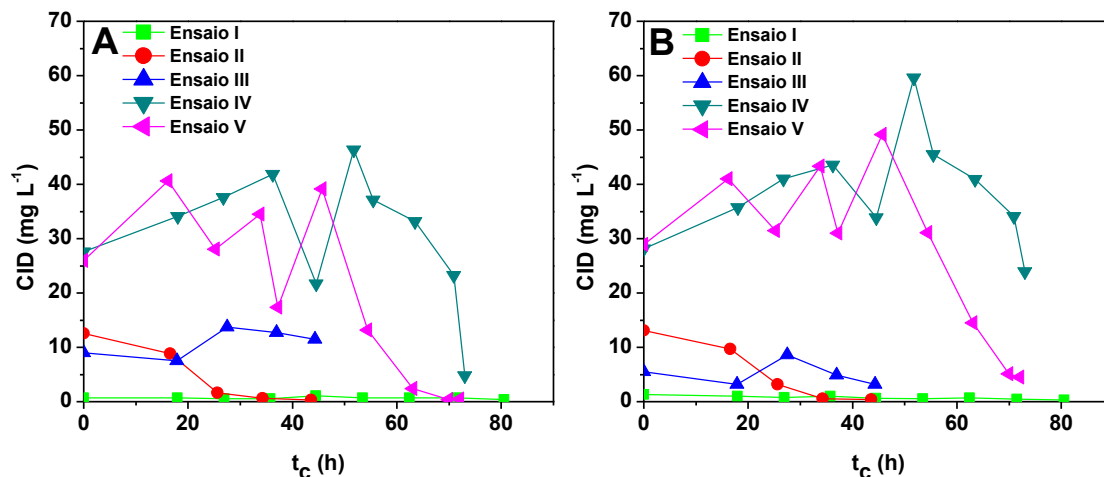


Figura 4.1 - Evolução da concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) em função do tempo no FBR1 (A) e FBR2 (B).

Relativamente à influência da radiação UV no consumo de CID, verificou-se que, para o ensaio III, o consumo de CID foi menor no FBR1 ($I_{UV} = 20 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) do que no FBR2 ($I_{UV} = 7 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$). Assim, concluiu-se que a intensidade de radiação UV a que a cultura está exposta influencia o consumo de CID por parte das microalgas. De um modo geral, verificou-se que ocorreu sempre consumo de CID, podendo ser associado ao crescimento das microalgas. O aumento de CID verificado em alguns dos ensaios corresponde aos pontos onde foram feitas as adições extras de carbono. Tyagi *et al.* (2003) estudaram o efeito da radiação UV-B na fixação de azoto pela cianobactéria *Nostoc muscorum*. Estes autores verificaram que a exposição desta cianobactéria a 30 minutos de radiação diminuía drasticamente a absorção de CO₂ por parte da mesma (78% de inibição). Mohsenpour *et al.* (2012) avaliaram o crescimento de duas espécies de microalgas (*C. vulgaris* e *Gloeotheca membranacea*) sob diferentes comprimentos de onda de luz visível (violeta, verde, laranja e vermelha). Estes autores verificaram que a concentração de biomassa da *C. vulgaris* aumentava rapidamente sob condições de luz laranja e verde, tendo registado taxas específicas de crescimento de 0,13 e 0,10 d⁻¹, respetivamente.

Relativamente ao CTD, à exceção do ensaio II, a concentração de CTD aumentou durante o tempo de cultivo (Figura 4.2 A e B). Este aumento da concentração de CTD está, certamente, relacionada com a libertação de compostos orgânicos para o meio por parte das microalgas, o que se reflete num aumento da concentração de COD. Os compostos libertados pelas microalgas incluem: polissacarídeos, polipeptídeos e ácidos orgânicos, em particular ácido glicólico (Fallowfield e Daft, 1988).

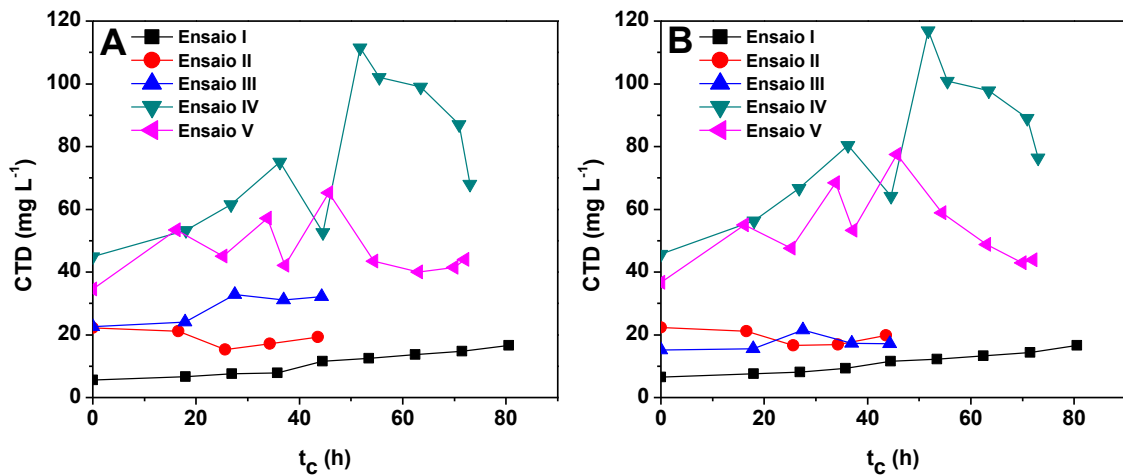


Figura 4.2 - Evolução da concentração de carbono total dissolvido (CTD) em função do tempo no FBR1 (A) e FBR2 (B).

Associado ao consumo de CID está a variação de pH, uma vez que a fixação de CID por parte das microalgas conduz à acumulação do ião hidróxido no meio de cultura e, consequentemente, ao aumento gradual do pH. Cerca de 24 h após o ajuste de pH, este era próximo de 10 em praticamente todos os ensaios, com exceção do ensaio I (pH=9), o que indicava o consumo de CID pelas microalgas.

4.3 Produção de biomassa

A monitorização da concentração de biomassa nos diferentes ensaios possibilitou a determinação de um conjunto de parâmetros que permitiram a comparação dos resultados obtidos neste trabalho com estudos semelhantes da literatura. Tendo em conta que os ensaios foram realizados em condições *outdoor*, a representação gráfica da concentração de biomassa foi feita em função do tempo de cultivo e em função da energia visível acumulada, uma vez que a intensidade de radiação solar não era constante ao longo do dia, nem de dia para dia. A Figura 4.3 (A e B) apresenta a evolução da concentração da biomassa em função do tempo de cultivo nos FBR1 e FBR2, respetivamente. Os resultados de cada um dos ensaios encontram-se mais detalhados no Anexo B – Figuras B.1 a B.5.

Em nenhum dos ensaios foi possível observar todas as fases típicas de um sistema de cultivo de microrganismos (fase de adaptação, exponencial, estacionária e morte celular) e, por vezes, foi difícil distinguir as fases existentes. O facto de as culturas estarem sujeitas a condições *outdoor* fez com que as microalgas tivessem constantemente que se adaptar a novas condições de cultivo, dificultando assim a distinção entre cada uma das fases.

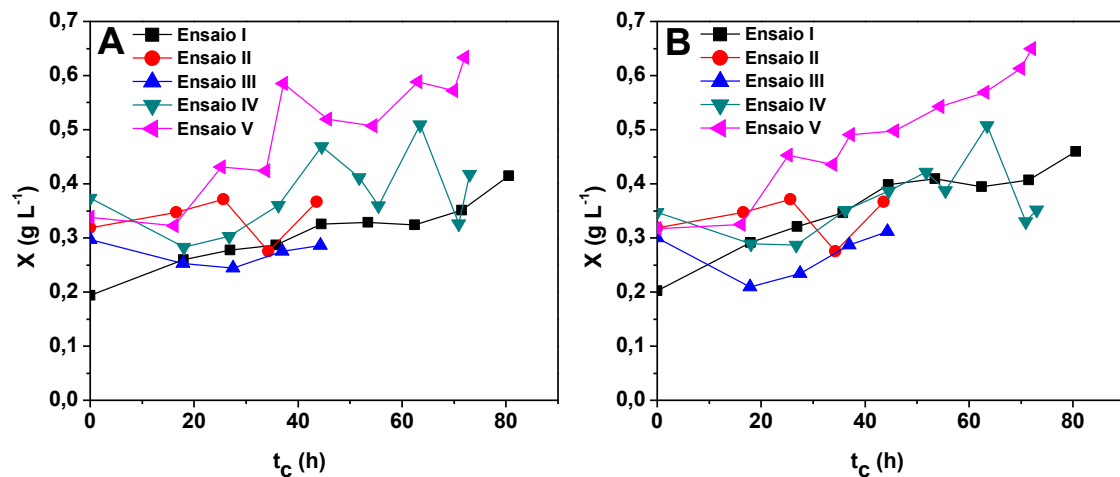


Figura 4.3 - Variação da concentração de biomassa em função do tempo no FBR1 (A) e FBR2 (B).

Em condições ótimas de cultivo, isto é, concentrações adequadas de nutrientes e condições ambientais pouco variáveis, seria espectável que a concentração da biomassa aumentasse durante o tempo de cultivo. Contudo, sendo o cultivo de microalgas extremamente dependente das condições ambientais, é natural que em condições *outdoor* se verifiquem flutuações na concentração da biomassa. Assim, em termos de produção de biomassa, o ensaio V com a cultura exposta a 29% da radiação incidente (FBR2) foi aquele que conseguiu o maior aumento de concentração de biomassa, atingindo um $X_{max} = 0,649 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Em contrapartida, o ensaio III com a cultura exposta a 100% (FBR1) da radiação incidente foi o que apresentou piores resultados com $X_{max} = 0,286 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Para além da intensidade da radiação incidente, existiu outro fator que poderá ter conduzido à obtenção deste resultado: caudal do fluido. No ensaio III, o caudal utilizado ($780 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$) foi menor do que nos outros ensaios ($1300 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$), o que implica uma menor turbulência do fluido ($Re = 6677$ e $Re = 11129$, respetivamente) e, consequentemente, menor frequência de ciclos de luz/escuro. Assim, a influência do caudal do fluido (com uma diferença de energia visível acumulada de cerca de $200 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$) no crescimento das microalgas é visível nos ensaios II (FBR2) e III (FBR2), tendo-se registado no ensaio III uma taxa específica de crescimento superior à observada no ensaio II ($0,016$ e $0,008 \text{ h}^{-1}$, respetivamente). O efeito da intensidade da radiação no crescimento das microalgas (para o caudal de $780 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$) é visível nos FBR1 ($I_{VIS} = 356 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, sem rede sombra) e FBR2 ($I_{VIS} = 106 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, com rede sombra) do ensaio III. Após a fase de adaptação em que ocorreu morte celular em ambos os FBR, foi possível constatar que a cultura do FBR2 cresceu mais rapidamente que a cultura do FBR1, tendo-se registado as seguintes taxas específicas de crescimento: (i) FBR1 – $0,005 \text{ h}^{-1}$ e (ii) FBR2 – $0,016 \text{ h}^{-1}$. Com base na taxa específica de crescimento observada em ambos os FBR dos ensaios IV ($I_{VIS} = 79 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) e V ($I_{VIS} = 143 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) foi possível avaliar o efeito da intensidade da radiação no crescimento das microalgas para o caudal de $1300 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$. Deste modo, foi possível concluir que para este caudal e

estas intensidades de radiação, o crescimento das microalgas foi superior nas condições do ensaio V, tendo-se registado as seguintes taxas específicas de crescimento: (i) ensaio IV – $0,02 \text{ h}^{-1}$ e (ii) ensaio V – $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Relativamente à variação da concentração da biomassa em função da energia visível acumulada (Figuras 4.4 A e B), o ensaio III com a cultura exposta a 100% da radiação incidente (FBR1), foi aquele que apresentou maior quantidade de energia visível acumulada ($2933 \text{ kJ}\cdot\text{L}^{-1}$). Contudo, tal como referido anteriormente, este ensaio foi o que apresentou piores resultados em termos de produção de biomassa. Por outro lado, o ensaio II com a cultura exposta apenas a 29% da radiação incidente (FBR2), foi aquele que apresentou menor quantidade de energia visível acumulada ($667 \text{ kJ}\cdot\text{L}^{-1}$). Consequentemente, em termos de produção de biomassa, este ensaio também não apresentou um aumento da concentração da biomassa significativo, sendo $X_{\max} = 0,312 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A quantidade de energia de radiação visível recebida pelo fotobiorreator no tempo de cultivo por unidade de volume foi de $1928 \text{ kJ}\cdot\text{L}^{-1}$ no ensaio V (FBR2), cujo crescimento das microalgas foi mais significativo. Posto isto, foi possível concluir que a produtividade da biomassa aumenta com a intensidade de radiação incidente até um determinado valor, a partir do qual a radiação passa a ser prejudicial para as microalgas. Wong e L. (2011) estudaram o efeito da radiação UV no crescimento da microalga *C. vulgaris*. Neste estudo, realizado em condições *outdoor* e *indoor*, avaliou-se o efeito de 3 tipos de radiação: (i) radiação fotossinteticamente ativa (RFA) + UVA; (ii) RFA+UVA+UVB e (iii) apenas RFA. Em condições *outdoor*, a cultura esteve exposta a intensidades médias de radiação ou fluxos fotónicos de: (i) UVA – $3,66$ a $27,98 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$; (ii) UVB – $1,61$ a $16,50 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$; e RFA – 282 a $1480 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Este estudo verificou que a radiação UVA não afetou o crescimento da microalga, contudo a radiação UVB afetou negativamente o crescimento.

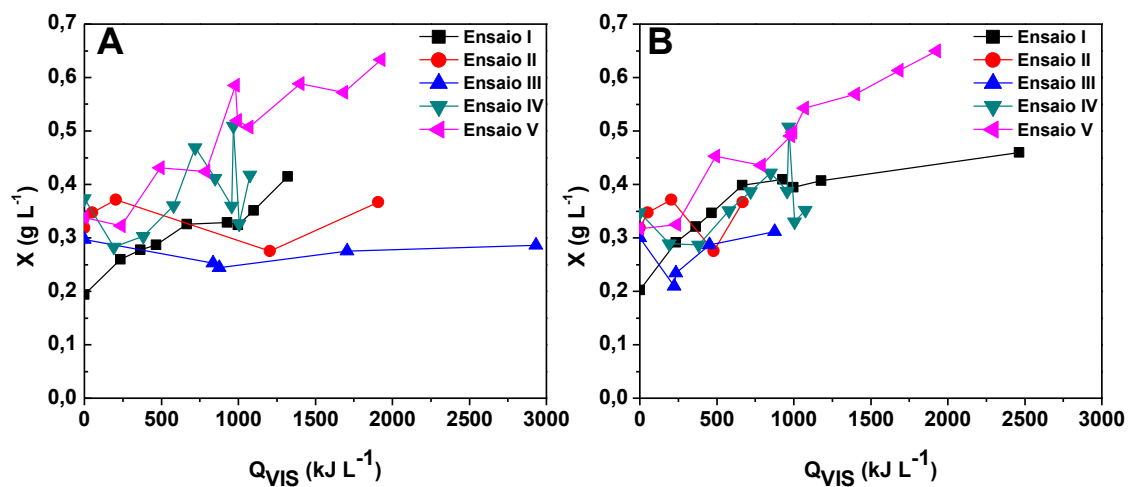


Figura 4.4 - Variação da concentração de biomassa em função da energia visível acumulada no FBR1 (A) e FBR2 (B).

A Tabela 4.2 apresenta um conjunto de parâmetros que permitiram a comparação entre ensaios, bem como a comparação com estudos da literatura. As duas últimas colunas apresentam as produtividades médias e as taxas específicas de crescimento, resultantes do ajuste dos pontos experimentais ao modelo exponencial presente na Equação 3.1 e respetivos erros padrão (δ_{μ} , ver Anexo A.4).

As produtividades médias registadas para a microalga *C. vulgaris* variaram de $6,8 \times 10^{-5}$ a $4,6 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Estes resultados demonstram que o melhor e o pior ensaio, em termos de produção de biomassa, foram o V (FBR2) e o IV (FBR2), respetivamente. Rodas-Gaitán *et al.* (2016) avaliaram a produção de biomassa da microalga *C. vulgaris* sob várias condições, entre as quais: (i) fonte de carbono NaHCO_3 + luz solar e (ii) fonte de carbono NaHCO_3 + iluminação LED. O estudo foi realizado em modo *batch* em recipientes de 15 L. Rodas-Gaitán *et al.* (2016) obtiveram as seguintes produtividades médias: $0,020 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para condições *outdoor* e $0,020 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para condições *indoor*. Posto isto, concluiu-se que a melhor produtividade média obtida se encontra abaixo (cerca de $\frac{1}{4}$) da gama de valores registados para esta microalga em condições *outdoor*.

Relativamente às taxas específicas de crescimento obtidas, estas variaram de $0,005$ a $0,03 \text{ h}^{-1}$. O ensaio V (FBR1) foi o que apresentou uma taxa específica de crescimento mais elevada ($0,03 \text{ h}^{-1}$). Em contrapartida, o ensaio III (FBR2) foi aquele que apresentou piores ($0,005 \text{ h}^{-1}$) resultados. Lam e Lee (2014) avaliaram a produção de biomassa da microalga *C. vulgaris* num FBR de colunas com 100 L de capacidade, em escala piloto, em condições *indoor* e *outdoor*. Em condições *indoor*, Lam e Lee (2014) obtiveram taxas específicas de crescimento entre $0,0019$ e $0,0048 \text{ h}^{-1}$. Em contrapartida, em condições *outdoor* as taxas específicas de crescimento

Tabela 4.2 - Parâmetros relacionados com a produção de biomassa.

Ensaio	FBR	$X_i \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$	$X_f \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$	$P_{X, med} \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	$\mu \pm \delta_{\mu} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
I	1	0,19	0,42	$2,7 \times 10^{-3}$	$0,013 \pm 0,007$
	2	0,20	0,46	$3,2 \times 10^{-3}$	$0,017 \pm 0,008$
II	1	0,33	0,38	$1,1 \times 10^{-3}$	$0,010 \pm 0,002$
	2	0,32	0,37	$1,1 \times 10^{-3}$	$0,008 \pm 0,004$
III	1	0,30	0,29	*	$0,005 \pm 0,004$
	2	0,30	0,31	$2,7 \times 10^{-4}$	$0,016 \pm 0,004$
IV	1	0,37	0,42	$6,0 \times 10^{-4}$	$0,02 \pm 0,01$
	2	0,35	0,35	$6,8 \times 10^{-5}$	$0,015 \pm 0,005$
V	1	0,34	0,63	$4,1 \times 10^{-3}$	$0,03 \pm 0,01$
	2	0,32	0,65	$4,6 \times 10^{-3}$	$0,02 \pm 0,02$

FBR – Fotobiorreator; μ – Taxa específica de crescimento; $P_{X, med}$ – Produtividade média de biomassa; X_f – concentração final de biomassa; X_i – concentração inicial de biomassa; * - Não foi possível determinar.

registadas variaram entre 0,0021 e 0,0037 h⁻¹. Deste modo, concluiu-se que as taxas específicas de crescimento obtidas neste estudo foram superiores às registadas pelos autores anteriormente citados.

4.4 Remoção de nutrientes

A análise da remoção de nutrientes apenas teve em conta o azoto e o fósforo, pois estes foram os que tiveram variações mais significativas em todos os ensaios.

4.4.1 Azoto

A única fonte de azoto adicionada ao meio de cultura foi KNO₃. Apesar do NO₃⁻ não ser a fonte preferencial de azoto para as microalgas, em termos experimentais este é mais prático, uma vez que o NO₃⁻ não é volátil e, consequentemente, não ocorrem perdas. Pelo contrário, o NH₄⁺, em função do pH, pode volatilizar sob a forma de amoníaco (NH₃). A variação da concentração de azoto em função do tempo no FBR1 e FBR2 está representada na Figuras 4.5 (A e B, respetivamente).

Em todos os ensaios, a concentração de N-NO₃⁻ diminuiu com o aumento do tempo de cultivo, devido ao consumo deste por parte das microalgas. Nas primeiras horas de cultivo foi possível constatar que o consumo de azoto foi relativamente baixo. Isto deveu-se à fase de adaptação das microalgas às novas condições (condições *outdoor*). Os ensaios que apresentaram melhores eficiências de remoção de azoto inorgânico foram os ensaios IV e V, tendo conseguido remover cerca de 26 mg·N·L⁻¹ do meio de cultivo. Em contrapartida, o ensaio III, com a cultura exposta a 100% da radiação incidente, foi aquele que apresentou piores eficiências de remoção, tendo conseguido remover apenas cerca de 4 mg·N·L⁻¹ do meio de cultivo. Esta situação já era espectável, uma vez que em termos de produtividade de biomassa

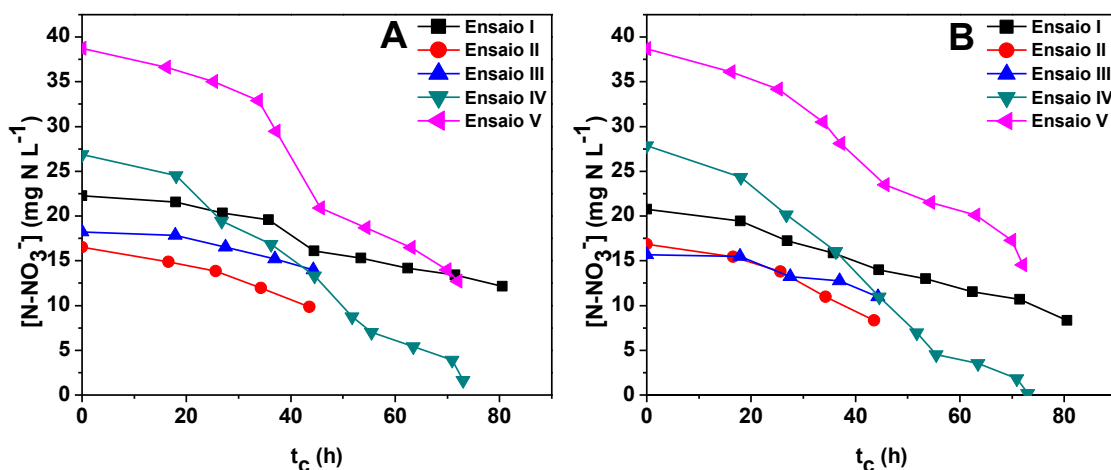


Figura 4.5 - Evolução da concentração de azoto inorgânico em função do tempo no FBR1 (A) e FBR2 (B).

este ensaio também havia sido o que apresentou piores resultados. Tendo em conta que não houve aumento significativo da concentração de biomassa, é natural que também não houvesse consumo de nutrientes.

A variação da concentração de azoto em função da energia visível acumulada no FBR1 e FBR2 está representada na Figura 4.6 (A e B, respetivamente). Em termos de energia visível acumulada, o ensaio IV conseguiu melhores eficiências de remoção com menor quantidade de energia visível acumulada ($Q_{VIS} = 1076 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$). Por outro lado, o ensaio III, com a cultura exposta a 100% da radiação incidente, em nada beneficiou com o aumento da quantidade de energia visível acumulada ($Q_{VIS} = 2933 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$). A quantidade de energia acumulada no ensaio III poderá ter ultrapassado o limite aceitável pelas microalgas e, conseqüentemente, inibido a atividade fotossintética da espécie em estudo. Assim, foi possível concluir que o aumento da quantidade de energia visível acumulada não potencia o consumo de nutrientes por parte das microalgas.

A Tabela 4.3 apresenta os principais parâmetros que foram determinados a partir dos pontos experimentais registados. Alguns dos parâmetros apresentados são as eficiências e taxas de remoção (ER e TR) e as taxas cinéticas de remoção, determinadas em função do tempo de cultivo (k_{N1}) e da quantidade de energia visível acumulada (k_{N2}). As cinéticas de remoção foram determinadas sob o pressuposto de que a cinética de remoção de NO_3^- se adaptava a modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem.

As taxas cinéticas de remoção vêm mais uma vez comprovar que o ensaio IV foi o que obteve melhores eficiências de remoção, atingindo uma taxa cinética de remoção de $k_{N1} = 0,026 \text{ h}^{-1}$ e $k_{N2} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{kJ}^{-1}$.

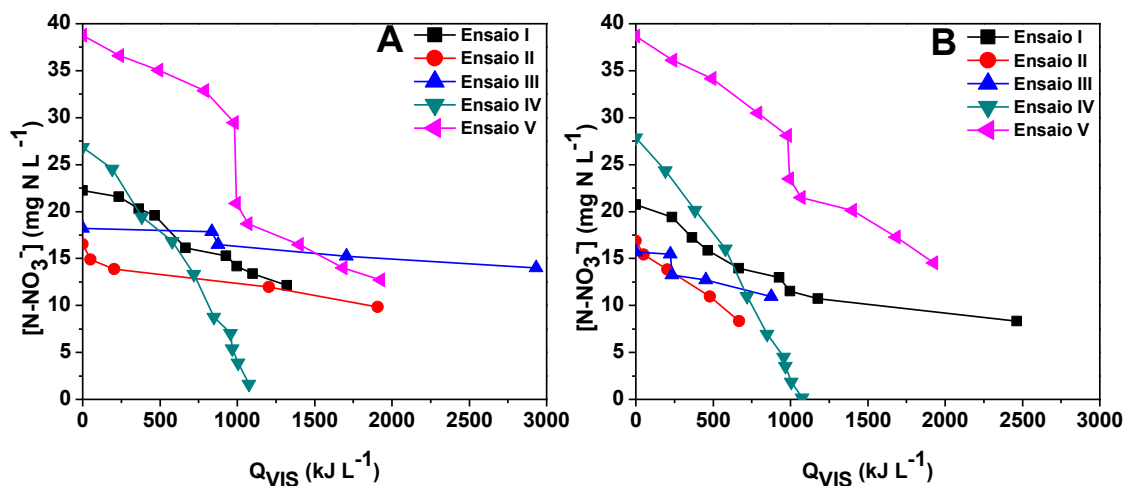


Figura 4.6 - Evolução da concentração de azoto inorgânico em função da energia visível acumulada no FBR1 (A) e FBR2 (B).

Tabela 4.3 - Parâmetros referentes à remoção de azoto inorgânico.

Ensaio	FBR	$k_{N1} \pm \delta_{k1}$ (h ⁻¹)	$k_{N2} \pm \delta_{k2}$ (L·kJ ⁻¹)	[N-NO ₃ ⁻] _f (mg·N·L ⁻¹)	ER (%)	TR (mg·N·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
I	1	0,008±0,002	$(4,8 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	12,1	46	0,13
	2	0,011±0,002	$(4,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	8,3	60	0,15
II	1	0,011±0,004	$(2 \pm 1) \times 10^{-4}$	9,8	41	0,15
	2	0,014±0,007	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	8,3	51	0,20
III	1	0,006±0,003	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	14,0	23	0,10
	2	0,007±0,004	$(4 \pm 3) \times 10^{-4}$	11,0	30	0,11
IV	1	0,022±0,006	$(1,4 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	1,7	94	0,35
	2	0,026±0,008	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	0,2	99	0,38
V	1	0,014±0,004	$(6 \pm 2) \times 10^{-4}$	12,7	67	0,36
	2	0,012±0,002	$(4,9 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	12,1	62	0,34

ER – Eficiência de remoção; FBR – Fotobiorreator; k_{N1} – Taxa cinética de remoção em função do tempo; k_{N2} – Taxa cinética de remoção em função da energia visível acumulada; [N-NO₃⁻]_f – Concentração final de N-NO₃⁻; TR – Taxa de remoção

Como já era espectável, a taxa cinética de remoção mais baixa ($k_{N1} = 0,006 \text{ h}^{-1}$ e $k_{N2} = 9,6 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{kJ}^{-1}$) corresponde ao ensaio III com a cultura exposta a 100% da radiação incidente. A partir das TR foi possível verificar que os ensaios IV e V foram aquelas que apresentaram remoções de azoto mais elevadas (0,34 – 0,38 mg·N·L⁻¹). Mais uma vez as TR permitiram reforçar a ideia de que as condições de cultivo do ensaio III foram as menos vantajosas para a microalga *C. vulgaris*, tendo obtido valores de TR = 0,10 e 0,11 mg·N·L⁻¹·h⁻¹. Åkerström *et al.* (2016) avaliaram a produção de biomassa e remoção de amónio e fosfato por parte da *Chlorella sp.* num licor de lamas, com exposição à radiação solar. Estes autores obtiveram taxas de remoção de azoto que variaram entre 0,53 e 1,5 mg·N·L⁻¹·h⁻¹. Deste modo, concluiu-se que as taxas de remoção obtidas no presente estudo (0,10 a 0,38 mg·N·L⁻¹·h⁻¹) estavam ligeiramente abaixo do intervalo de valores obtidos pelos autores supracitados, pese embora neste trabalho se tenha fornecido como fonte de azoto NO₃⁻ e não NH₄⁺ (fonte preferencial).

Um dos objetivos do presente estudo é avaliar a introdução do cultivo de microalgas nas ETARs. Assim, tendo em conta o Decreto-lei n.º 348/98, em que o VLE de azoto é 15 mg·N·L⁻¹ (para zonas com 10 000 a 100 000 habitantes equivalentes) fez-se a comparação dos resultados obtidos com a legislação. Através da concentração final de azoto obtida em cada um dos ensaios, verificou-se que em todos os ensaios o VLE para o azoto foi alcançado, habilitando assim a descarga deste efluente sintético (em termos de azoto) no meio recetor hídrico.

Por fim, determinaram-se os rendimentos específicos de biomassa para azoto inorgânico ($Y_{X/N}$), permitindo assim efetuar mais comparações com estudos da literatura. Os valores de $Y_{X/N}$ estão presentes na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Rendimentos específicos de biomassa em termos de azoto.

Ensaio	FBR	$Y_{X/N}$ ($\text{g}_b \cdot \text{g}_N^{-1}$)
I	1	21,8
	2	20,6
II	1	7,03
	2	5,74
III	1	*
	2	2,54
IV	1	1,75
	2	0,18
V	1	11,3
	2	13,7

FBR – Fotobiorreator; $Y_{X/N}$ – Rendimento específico da biomassa em termos de azoto; * - Não foi possível determinar.

Juneja (2015) avaliou o crescimento da microalga *C. vulgaris* em reatores *batch* sob condições limitantes de nitrato e dióxido de carbono, considerando o efeito da luz e da temperatura. Nestas condições Juneja (2015) obteve um rendimento específico de biomassa para o nitrato de $2,86 \text{ g}_b \cdot \text{g}_N^{-1}$. Comparativamente com os rendimentos específicos obtidos no presente estudo (0,18 a $21,8 \text{ g}_b \cdot \text{g}_N^{-1}$), foi possível constatar que estes eram, na sua maioria, superiores aos valores obtidos pela autora supracitada. Importa ressaltar que o presente estudo não foi realizado em condições limitantes de nenhum nutriente.

4.4.2 Fósforo

À semelhança do azoto, também a única fonte de fósforo adicionada ao meio cultivo foi inorgânica: KH_2PO_4 . A variação da concentração de fósforo em função do tempo no FBR1 e FBR2 está representada na Figura 4.7 A e B, respetivamente.

De um modo geral, a concentração de fósforo diminuiu gradualmente com o tempo, com exceção para o ensaio IV. Neste ensaio, na primeira semana, verificou-se uma diminuição acentuada da concentração de fósforo com tempo e, no início da segunda semana de cultivo, registou-se um aumento da concentração de fósforo no meio. Este aumento da concentração de fósforo poderá estar relacionado com a precipitação do fósforo com o cálcio sob a forma de hidroxiapatita (HAP) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Anexo B.6). Segundo Wang e Nancollas (2008) a razão molar Ca/P necessária para que ocorra a precipitação do fosfato de cálcio na forma de HAP é 1,67. Assim, a razão molar Ca/P presente no período em que ocorreu o aumento de concentração foi de 2,67 no FBR1 e 1,60 no FBR2. Posto isto, concluiu-se que o aumento de concentração terá ocorrido devido à dissolução da HAP que terá precipitado na fase em que a concentração de fósforo diminuiu rapidamente.

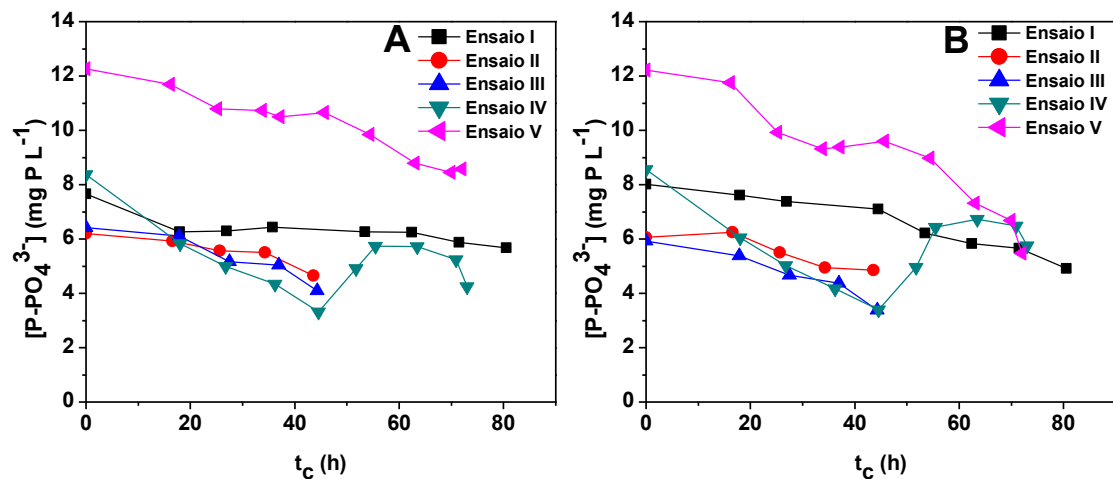


Figura 4.7 - Evolução da concentração de fósforo inorgânico em função do tempo no FBR1 (A) e FBR2 (B).

Descartando o ensaio IV devido à possibilidade de precipitação do fósforo com o cálcio, o ensaio V (FBR2) foi o que conseguiu melhores eficiências de remoção de fósforo, tendo atingido uma concentração final de $[P - PO_4^{3-}] = 5,5 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{L}^{-1}$. Por oposição, o ensaio II (FBR2) foi o que apresentou uma eficiência menor, tendo atingido uma concentração final de $[P - PO_4^{3-}] = 4,8 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{L}^{-1}$.

A variação da concentração de fósforo em função da energia visível acumulada no FBR1 e 2 está representada na Figura 4.8 A e B, respetivamente. Os ensaios que obtiveram a melhor e a pior eficiência de remoção apresentaram as seguintes quantidades de energia visível acumulada, respetivamente: (i) ensaio V - FBR2, $Q_{VIS} = 1909 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$ e (ii) ensaio II - FBR2, $Q_{VIS} = 667 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$. A Tabela 4.5 apresenta os principais parâmetros que foram determinados a partir dos pontos experimentais registados. As taxas cinéticas de remoção revelaram que o ensaio III (FBR2) foi o que obteve melhores velocidades de remoção, atingindo uma taxa cinética de remoção de $k_{P1} = 0,011 \text{ h}^{-1}$ e $k_{P2} = 7 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{kJ}^{-1}$. Por oposição, a taxa cinética de remoção mais baixa ($k_{P1} = 0,003 \text{ h}^{-1}$), em função do tempo, correspondeu ao ensaio I (FBR1). Relativamente à taxa cinética de remoção em função da energia visível acumulada, o valor mais baixo ($k_{P2} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{kJ}^{-1}$) foi registado no ensaio II (FBR1).

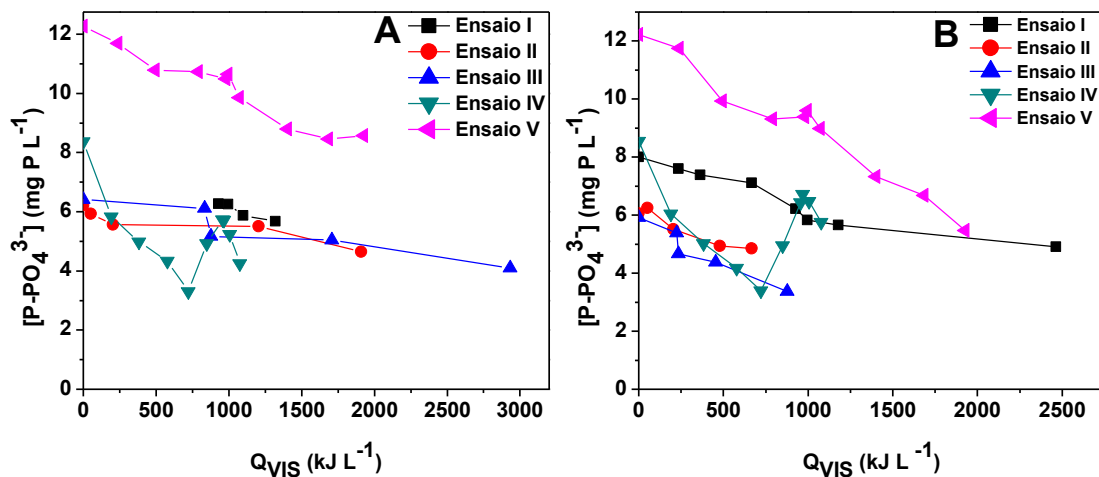


Figura 4.8 - Evolução da concentração de fósforo inorgânico em função da energia visível acumulada no FBR1 (A) e FBR2 (B).

A partir das TR foi possível verificar que o ensaio V (FBR2) foi aquele que apresentou a TR mais elevadas (0,94 mg·P·L⁻¹·h⁻¹). Por oposição, o ensaio I (FBR1) e ensaio II (FBR2) foram aqueles que apresentaram uma TR mais baixa ($TR = 0,025$ e $0,028$ mg·P·L⁻¹·h⁻¹, respetivamente). Åkerström *et al.* (2016) avaliaram a produção de biomassa e remoção de amónio e fosfato por parte da *Chlorella sp.* num licor de lamas, com exposição a radiação solar. Estes autores obtiveram taxas de remoção de fósforo que variaram entre 0,054 e 0,16 mg·P·L⁻¹·h⁻¹. Assim, concluiu-se que as taxas de remoção obtidas no presente estudo (0,025 a 0,94 mg·P·L⁻¹·h⁻¹) estavam relativamente próximas às obtidas pelos autores supracitados.

Tabela 4.5 - Parâmetros referentes à remoção de fósforo inorgânico.

Ensaio	FBR	$k_{P1} \pm \delta_{k1}$ (h ⁻¹)	$k_{P2} \pm \delta_{k2}$ (L·kJ ⁻¹)	$[P-PO_4^{3-}]_f$ (mg·P·L ⁻¹)	ER (%)	TR (mg·P·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
I	1	0,003±0,001	$(1,6 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	5,7	26	0,025
	2	0,006±0,001	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	4,9	39	0,039
II	1	0,006±0,003	$(1,2 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	4,6	25	0,036
	2	0,006±0,004	$(4 \pm 2) \times 10^{-4}$	4,8	20	0,028
III	1	0,009±0,005	$(1,5 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	4,1	36	0,052
	2	0,011±0,005	$(7 \pm 2) \times 10^{-4}$	3,4	43	0,057
IV	1	0,007±0,005	$(4 \pm 3) \times 10^{-4}$	4,2	49	0,056
	2	0,003±0,003	$(2 \pm 2) \times 10^{-4}$	5,8	33	0,038
V	1	0,0050±0,0009	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	8,6	30	0,051
	2	0,009±0,002	$(3,6 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	5,5	55	0,094

ER – Eficiência de remoção; FBR – Fotobiorreator; k_{P1} – Taxa cinética de remoção em função do tempo; k_{P2} – Taxa cinética de remoção em função da energia visível acumulada; $[P-PO_4^{3-}]_f$ – Concentração final de P-PO₄³⁻; TR – Taxa de remoção

De acordo com o Decreto-lei n.º 348/98, o VLE para o fósforo é de $2 \text{ mg}\cdot\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$. Comparativamente com as concentrações finais de fósforo registadas, foi possível constatar que nenhum dos ensaios atingiu o VLE presente no Decreto-lei anteriormente referido. Assim, para que este efluente sintético pudesse ser descarregado (em termos de fósforo) seriam necessários tratamentos adicionais para remover o fósforo.

Os rendimentos específicos da biomassa obtidos em termos de fósforo inorgânico ($Y_{X/P}$) são apresentados na Tabela 4.6. Ruiz *et al.* (2011) avaliaram a influência da concentração de azoto e fósforo nas suas cinéticas de remoção em águas residuais urbanas por parte da *C. vulgaris*, em condições *indoor*. Estes autores obtiveram rendimentos específicos da biomassa em termos de fósforo inorgânico que variaram entre 0,04 e $470,57 \text{ g}_b\cdot\text{g}_P^{-1}$. No presente estudo, obtiveram-se rendimentos específicos de biomassa entre 1,78 e $112 \text{ g}_b\cdot\text{g}_P^{-1}$. Deste modo, constatou-se que os rendimentos obtidos se encontravam dentro da gama de valores referida pelos autores anteriormente citados, pese embora o facto de este trabalho ter sido realizado em condições *outdoor*.

Tabela 4.6 - Rendimentos específicos da biomassa em termos de fósforo

Ensaio	FBR	$Y_{X/P} (\text{g}_b\cdot\text{g}_P^{-1})$
I	1	112
	2	82,5
II	1	30,2
	2	40,5
III	1	*
	2	4,71
IV	1	10,7
	2	1,78
V	1	80,0
	2	49,2

FBR – Fotobiorreator; $Y_{X/P}$ – Rendimento específico da biomassa em termos de fósforo; * - Não foi possível determinar.

4.5 Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética refere-se à quantidade de energia luminosa que as algas e plantas são capazes de converter em energia química através da fotossíntese (Gravitis, 2008). Algumas plantas na Natureza têm, geralmente, 1 – 2% de eficiência de conversão. A cana-de-açúcar pode ter quase 8% de eficiência, contudo, muitas das plantas, possuem apenas 0,1% de eficiência. A Tabela 4.7 apresenta a eficiência fotossintética obtida para microalga *C. vulgaris* em cada um dos ensaios.

Tabela 4.7 - Eficiência fotossintética do FBR.

Ensaio	FBR	Q_{vis} (kJ·L ⁻¹)	η (%)
I	1	1320	0,18
	2	2464	0,14
II	1	1909	0,061
	2	667,2	0,14
III	1	2933	0,026
	2	876,3	0,21
IV	1	1076	0,31
	2	1076	0,23
V	1	1928	0,24
	2	1928	0,30

FBR – Fotobiorreator; η – Eficiência fotossintética; Q_{vis} – Energia visível acumulada.

Os ensaios que apresentaram eficiências fotossintéticas menores foram precisamente aqueles que em que a cultura esteve exposta a 100% da radiação incidente. Quanto maior foi o intervalo de tempo de exposição da cultura à radiação, menor foi a eficiência fotossintética obtida:

- Ensaio I, FBR2: 15 horas de exposição – $\eta = 0,14\%$;
- Ensaio II, FBR1: 22 horas de exposição – $\eta = 0,061\%$;
- Ensaio III, FBR1: 44 horas de exposição – $\eta = 0,026\%$.

Assim, concluiu-se que a exposição da cultura a elevadas intensidades de radiação num curto período de tempo influencia negativamente a eficiência fotossintética do FBR. Por oposição, a exposição da cultura a intensidades de radiação moderadas aumenta a eficiência fotossintética (ensaio IV e V).

de Vree *et al.* (2015) avaliaram a eficiência fotossintética da *Nannochloropsis sp.* em quatro fotobiorreatores (placas planas, tubular horizontal, tubular vertical e lagoa) à escala piloto, em condições *outdoor*. Para o fotobiorreator tubular horizontal, estes autores obtiveram uma eficiência máxima de 1,8%. As eficiências fotossintéticas obtidas neste estudo foram razoavelmente inferiores, possivelmente devido ao efeito dos CPC nas culturas.

5 CONCLUSÃO

Os principais objetivos deste trabalho consistiam na avaliação da eficiência fotossintética das microalgas num fotobiorreator equipado com coletores parabólicos compostos, na produção de biomassa e na remoção de nutrientes de um efluente sintético por parte da *C. vulgaris*. Para tal, inoculou-se a microalga *C. vulgaris* num fotobiorreator equipado com CPCs sob diferentes condições de cultivo.

Relativamente à eficiência fotossintética das microalgas, verificou-se que a exposição da cultura a somente 29% da radiação incidente com um caudal de $1300 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ foram as condições de cultivo que permitiram obter melhores eficiências, atingindo-se uma eficiência máxima de 0,31%.

Em termos de produção de biomassa, as condições de cultivo supracitadas foram exatamente as mesmas que permitiram obter uma concentração final de biomassa e valores de produtividade superiores. Nestas condições, a taxa específica de crescimento máxima foi de $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Por fim, no que diz respeito à remoção de nutrientes, este estudo permitiu reunir dados sobre a eficiência da *C. vulgaris* na remoção de azoto (NO_3^-) e fósforo (PO_4^{3-}) inorgânico. Mais uma vez, as condições de cultivo acima referidas foram aquelas que permitiram obter taxas cinéticas de remoção de azoto, quer em função do tempo quer em função da energia visível acumulada, mais elevadas. Em função do tempo obteve-se uma taxa cinética máxima de remoção de $0,26 \text{ h}^{-1}$ e, em função da energia visível acumulada, registou-se uma taxa cinética máxima de remoção de $1,7 \times 10^{-3} \text{ L}\cdot\text{kJ}^{-1}$. Relativamente ao fósforo, verificou-se que as condições de cultivo que permitiram obter melhores resultados foram a exposição da cultura a somente 29% da radiação incidente com um caudal de fluído de $780 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. Nestas condições a taxa cinética máxima de remoção de fósforo foi de $0,011 \text{ h}^{-1}$, em função do tempo, e de $6,5 \times 10^{-4} \text{ L}\cdot\text{kJ}^{-1}$, em função da energia visível acumulada.

Assim, foi possível concluir que as microalgas possuem de facto um elevado potencial para serem cultivadas em ETARs, uma vez que apresentaram bons resultados na remoção de alguns nutrientes, principalmente azoto. O tratamento de águas residuais conjugado com a produção de biomassa poderá trazer desde logo inúmeras vantagens para o ambiente, uma vez que permite tratar efluentes e, em contrapartida, produzir biomassa com capacidade para inúmeras aplicações.

6 AVALIAÇÃO DO TRABALHO REALIZADO

6.1 Objetivos realizados

Inicialmente, os objetivos estipulados para o presente estudo prendiam-se com a avaliação da eficiência fotossintética das microalgas cultivadas em novos fotobiorreatores com CPCs, a remoção de nutrientes e a avaliação da produção de biomassa. Quanto à avaliação da eficiência fotossintética pretendia-se testar diferentes condições de cultivo e, consequentemente, verificar em que condições se obtinha a melhor eficiência. Este objetivo foi cumprido, uma vez que se obtiveram diferentes eficiências em função das condições testadas.

Relativamente à remoção de nutrientes, pretendeu-se avaliar, essencialmente, a remoção de azoto e fósforo sob diferentes condições de cultivo. Deste modo, foi possível obter eficácias de remoção destes nutrientes, bem como a sua velocidade de remoção para todas as condições testadas, por ajuste de um modelo cinético. Assim, foi possível constatar o potencial das microalgas como forma de tratamento de águas residuais, através da remoção dos nutrientes presentes nas mesmas.

Quanto à produção de biomassa, pretendia-se analisar o crescimento da espécie *C. vulgaris* num fotobiorreator com CPCs sob diferentes condições de cultivo, através da determinação das taxas de crescimento e respetivas produtividades. À semelhança dos outros objetivos, também este foi cumprido, tendo-se obtido resultados para ambos os parâmetros, em todos os ensaios. Com base nestes resultados, identificaram-se condições ótimas de cultivo para o fotobiorreator em estudo.

6.2 Limitações e trabalho futuro

Ao longo da realização deste trabalho foram encontradas algumas limitações na vertente prática/laboratorial. Um dos aspetos mais relevantes prendeu-se com o arrefecimento da cultura, por forma a manter a mesma dentro da gama de temperaturas ótima. Para além deste, o facto de a cultura não poder permanecer nos tanques, no período do fim-de-semana, devido à possibilidade de sobreaquecimento da mesma, implicou o transporte da cultura para condições *indoor*, no período referido.

Quanto às recomendações para trabalho futuro, sugere-se fazer o cultivo das microalgas, de modo a concentrar a cultura, em tubos de vidro normal e, posteriormente, sujeitar a cultura a condições de *stress* de radiação UV (tubos de borossilicato) por forma a analisar possíveis

alterações nas microalgas, tais como produção de carotenoides. Para além disto, sugere-se o cultivo de microalgas com diferentes superfícies refletoras, de modo a aferir qual a superfície refletora que potencia o cultivo da espécie em estudo. Por fim, sugere-se ainda o cultivo da *C. vulgaris* num efluente real, uma vez que assim seria possível estudar o comportamento da microalga em condições próximas das reais.

Referências

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci* 19, 257-275.
- Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol* 118, 61-66.
- Åkerström, A.M., Mortensen, L.M., Rusten, B., Gislerød, H.R., 2016. Biomass production and removal of ammonium and phosphate by *Chlorella* sp. in sludge liquor at natural light and different levels of temperature control. *SpringerPlus* 5, 676.
- Anbalagan, A., 2016. Indigenous microalgae-activated sludge cultivation system for wastewater treatment. Mälardalen University.
- Arend, K.K., Beletsky, D., DePinto, J., Ludsing, S.A., Roberts, J.J., 2011. Seasonal and interannual effects of hypoxia on fish habitat quality in central Lake Erie. *Freshwater Biology* 56, 366 - 383.
- Aslan, S., Kapdan, I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28, 64-70.
- Athanasoulia, E., Melidis, P., Aivasidis, A., 2012. Optimization of biogas production from waste activated sludge through serial digestion. *Renewable Energy* 47, 147-151.
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41, 1489-1500.
- Becker, E.W., 1994. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, U. K.
- Benemann, J.R., Oswald, W.J., 1996. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Final report. ; California Univ., Berkeley, CA (United States). Dept. of Civil Engineering, p. Medium: ED; Size: 214 p.
- Bich, N.N., Yaziz, M.I., Bakti, N.A.K., 1999. Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. *Water Research* 33, 2357-2362.
- Borowitzka, M.A., 1988. Fats, oils and carbohydrates, Borowitzka M. A., Borowitzka L. J. (eds) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 257–287.

- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., 1988. Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press.
- Butler, E., Hung, Y.-T., Suleiman Al Ahmad, M., Yeh, R.Y.-L., Liu, R.L.-H., Fu, Y.-P., 2017. Oxidation pond for municipal wastewater treatment. *Applied Water Science* 7, 31-51.
- Cabanelas, I.T.D., Arbib, Z., Chinalia, F.A., Souza, C.O., Perales, J.A., Almeida, P.F., Druzian, J.I., Nascimento, I.A., 2013. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy* 109, 283-290.
- Campos, J.L., Valenzuela-Heredia, D., Pedrouso, A., Val del Río, A., Belmonte, M., Mosquera-Corral, A., 2016. Greenhouse Gases Emissions from Wastewater Treatment Plants: Minimization, Treatment, and Prevention. *Journal of Chemistry* 2016, 12.
- Cardinale, B.J., 2011. Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature* 472, 86-89.
- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X., 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress* 22, 1490 - 1506.
- Cerón García, M.C., Sánchez Mirón, A., Fernández Sevilla, J.M., Molina Grima, E., García Camacho, F., 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry* 40, 297-305.
- Chen, C.Y., Kao, P.C., Tsai, C.J., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoerythrin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology* 145, 307-312.
- Cheng, C.Y., 2015. Tratamento preliminar (obra de entrada) de uma ETAR. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- Cheng, C.Y., 2016. Tecnologias dos processos de lamas ativadas. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W., Das, K.C., 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology* 101, 3097-3105.
- Chiranjeevi, P., Mohan, S.V., 2016. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renewable Energy* 98, 64-71.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25, 294-306.

- Cho, S., Luong, T.T., Lee, D., Oh, Y.-K., Lee, T., 2011. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 8639-8645.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management. E&FN Spon, London.
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol Adv* 29, 686-702.
- Chu, W.-L., See, Y.-C., Phang, S.-M., 2008. Use of immobilised *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. *Journal of Applied Phycology* 21, 641.
- Correll, D.L., 1998. The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review. *Journal of Environmental Quality* 27, 261 - 266.
- Craggs, R., Sutherland, D., Campbell, H., 2012. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *Journal of Applied Phycology* 24, 329-337.
- Danquah, M.K., Ang, L., Uduman, N., Moheimani, N., Forde, G.M., 2009a. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, 1078-1083.
- Danquah, M.K., Gladman, B., Moheimani, N., Forde, G.M., 2009b. Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. *Chemical Engineering Journal* 151, 73-78.
- Dasgupta, C.N., Jose Gilbert, J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S.A., Skjanes, K., Das, D., 2010. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 10218-10238.
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res* 38, 4222-4246.
- de la Noue, J., de Pauw, N., 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances* 6, 725-770.
- de la Noüe, J., Laliberté, G., Proulx, D., 1992. Algae and waste water. *Journal of Applied Phycology* 4, 247-254.

- de Vree, J.H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2015. Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for Biofuels* 8, 215.
- EPA, 1997. Waste Water Treatment Manuals. The Environmental Protection Agency, Ireland.
- EPA Office of Water, 2006. Wastewater Management Fact Sheet, Energy Conservation.
- Esteves, F.A., 1998. Fundamentos de Limnologia. Interciência, Rio de Janeiro.
- Fallowfield, H.J., Daft, M.J., 1988. The extracellular release of dissolved organic carbon by freshwater cyanobacteria and algae and the interaction with *Lysobacter* CP-1. *British Phycological Journal* 23, 317-326.
- Feng, Y., Li, C., Zhang, D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology* 102, 101-105.
- Godos, I.d., Blanco, S., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R., 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology* 100, 4332-4339.
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K., 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research* 7, 51-57.
- Goncalves, A.L., Pires, J.C.M., Simoes, M., 2016. The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach. *RSC Advances* 6, 22896-22907.
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research* 24, 403 - 415.
- Gouveia, L., Empis, J., 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4, 227-233.
- Gravitis, J., 2008. Biorefinery: Biomaterials and Bioenergy from Photosynthesis, within Zero Emission Framework, in: Barbir, F., Ulgiati, S. (Eds.), *Sustainable Energy Production and Consumption: Benefits, Strategies and Environmental Costing*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 327-337.
- Guštin, S., Marinšek-Logar, R., 2011. Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *Process Safety and Environmental Protection* 89, 61-66.

- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1037-1047.
- Hoek, V.D., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. *Algae: an introduction to phycology*.
- Hoffmann, J.P., 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology* 34, 757 - 763.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 631-635.
- Ji, M.-K., Kim, H.-C., Sapireddy, V.R., Yun, H.-S., Abou-Shanab, R.A.I., Choi, J., Lee, W., Timmes, T.C., Inamuddin, Jeon, B.-H., 2013. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 2701-2710.
- Jia, H., Yuan, Q., Rein, A., 2017. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae - bacteria consortia. *Cogent Environmental Science* 2, 1275089.
- Juneja, A., 2015. Model Predictive Control for Optimum Algal Growth, Department of Biological and Ecological Engineering. Oregon State University, p. 271.
- Kochen, L.H., 2010. Caracterização de fotobioreator air-lift para cultivo de microalgas, Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R., 2010. Culture of microalgae *chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160, 9-18.
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2014. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a pilot-scale sequential-baffled column photobioreactor for biomass and biodiesel production. *Energy Conversion and Management* 88, 399-410.
- Lam, M.K., Yusoff, M.I., Uemura, Y., Lim, J.W., Khoo, C.G., Lee, K.T., Ong, H.C., 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy* 103, 197-207.
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae – A Literature Review. *Vatten* 62, 31 - 38.
- Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution* 89, 59-66.

- Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1997. Wastewater Nutrients (N and P) Removal by Carrageenan and Alginate Immobilized *Chlorella Vulgaris*. *Environmental Technology* 18, 945-951.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, ix + 295 pp.
- Lavoie, A., de la Noüe, J., 1983. Harvesting microalgae with chitosan. *Journal of the World Mariculture Society* 14, 685-694.
- Lee, K., Lee, C.-G., 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 6, 194-199.
- Lee, R.E., 2008. *Phycology*, Fourth ed. Cambridge University Press, United States of America.
- Lehtiniemi, M., Engström-Öst, J., Viitasalo, M., 2005. Turbidity decreases anti-predator behaviour in pike larvae, *Esox lucius*. *Environmental Biology of Fishes* 73, 1-8.
- Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R., 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 5138-5144.
- Li, Y., Hosman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N., 2008. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress* 24, 815 - 820.
- Lim, S.-L., Chu, W.-L., Phang, S.-M., 2010. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology* 101, 7314-7322.
- Lower, S.K., 1999. Carbonate equilibria in natural waters. Simon Fraser University. Burnaby, Canadá.
- Martin, J.H., Knauer, G.A., Karl, D.M., Broenkow, W.W., 1987. VERTEX: carbon cycling in the northeast Pacific. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 34, 267-285.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217-232.
- McCarty, P.L., Bae, J., Kim, J., 2011. Domestic Wastewater Treatment as a Net Energy Producer—Can This be Achieved? *Environmental Science & Technology* 45, 7100-7106.

- Minster, J.-F., Boulahdid, M., 1987. Redfield ratios along isopycnal surfaces—a complementary study. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 34, 1981-2003.
- Mohsenpour, S.F., Richards, B., Willoughby, N., 2012. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology* 125, 75-81.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Ación Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances* 20, 491-515.
- Molina Grima, E., Fernández, F.G.A., García Camacho, F., Chisti, Y., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology* 70, 231-247.
- Mostafa, S.S.M., 2012. Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications, in: Dhal, N.K., Sahu, S.C. (Eds.), *Plant Science. InTech*, Rijeka, p. Ch. 12.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., Kebede-Westhead, E., 2008. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology* 99, 8137-8142.
- Munir, N., Imtiaz, A., Sharif, N., Naz, S., 2015. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid contents. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 25 (2), 546 - 553.
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research* 40, 2799-2815.
- Nascimento, I.A., Cabanelas, I.T.D., Santos, J.N.d., Nascimento, M.A., Sousa, L., Sansone, G., 2015. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: Effects of CO₂-supplementation and nutrient levels in cultures. *Algal Research* 8, 53-60.
- Novoveská, L., Zapata, A.K.M., Zabolotney, J.B., Atwood, M.C., Sundstrom, E.R., 2016. Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in large-scale offshore photobioreactors. *Algal Research* 18, 86-94.
- OCDE, 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE Publishing.
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20, 459-466.

- Olguín, E.J., 2003. Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22, 81-91.
- Oswald, W., Gotass, H., 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Amer. Soc. Civil Engrs.*; (United States), Medium: X; Size: Pages: 73.
- Oswald, W.J., 2003. My sixty years in applied algology. *Journal of Applied Phycology*.
- Park, J.B., Craggs, R.J., Shilton, A.N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour Technol* 102, 35-42.
- Pasqualino, J.C., Meneses, M., Castells, F., 2011. Life Cycle Assessment of Urban Wastewater Reclamation and Reuse Alternatives. *Journal of Industrial Ecology* 15, 49-63.
- Pizarro, C., Mulbry, W., Bliersch, D., Kangas, P., 2006. An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. *Ecological Engineering* 26, 321-327.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 287-293.
- Pushparaj, B., Pelosi, E., Tredici, M.R., Pinzani, E., Materassi, R., 1997. As integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 9, 113-119.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D., 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews* 56, 99-151.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhom, S.E., 2001. *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88, 3411-3424.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science.
- Rocha, L.G., 2012. Dossiê técnico: Cultivo de Microalgas. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. Brasil.
- Rodas-Gaitán, H.A., Rodríguez-Fuentes, H., Luna-Maldonado, A.I., Jáuregui, J.A., Vidales-Contreras, J.A., Flores-Breceda, H., 2016. Biomass production and quality estimation of

- Chlorella vulgaris* (CLV2) under large scale production conditions. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 4, 493-498.
- Ruiz, J., Álvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barragán, J., Perales, J.A., 2011. Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentration on Their Removal Kinetic in Treated Urban Wastewater by *Chlorella Vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation* 13, 884-896.
- Safonova, E., Kvitko, K.V., Iankevitch, M.I., Surgko, L.F., Afti, I.A., Reisser, W., 2004. Biotreatment of Industrial Wastewater by Selected Algal-Bacterial Consortia. *Engineering in Life Sciences* 4, 347-353.
- Santos, L., Calazans, N., Marinho, Y., Santos, A., Nascimento, R., Vasconcelos, R., Dantas, D., Gálvez, A., 2011. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. Minas Gerais. Brasil.
- Schindler, D.W., 2006. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnology and Oceanography* 51, 356-363.
- Sforza, E., Ramos-Tercero, E.A., Gris, B., Bettin, F., Milani, A., Bertucco, A., 2014. Integration of *Chlorella protothecoides* production in wastewater treatment plant: From lab measurements to process design. *Algal Research* 6, 223-233.
- Shaffer, G., Bendtsen, J., Ulloa, O., 1999. Fractionation during remineralization of organic matter in the ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 46, 185-204.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report. ; National Renewable Energy Lab., Golden, CO. (US), p. Medium: ED; Size: 325 pages.
- Sicko-Goad, L., Andresen, N.A., 1991. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *Journal of Phycology* 27, 710-718.
- Silva-Benavides, A.M., Torzillo, G., 2011. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of Applied Phycology* 24, 267-276.
- Silva, N.F.P., Gonçalves, A.L., Moreira, F.C., Silva, T.F.C.V., Martins, F.G., Alvim-Ferraz, M.C.M., Boaventura, R.A.R., Vilar, V.J.P., Pires, J.C.M., 2015. Towards sustainable

microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Research* 11, 350-358.

Singh, D., Yadav, K., 2015. Biofixation of carbon dioxide using mixed culture of microalgae. *Indian Journal of Biotechnology* 14, 228-232.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87-96.

Sydney, E.B., da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., de Carvalho, J.C., Woiciechowski, A.L., Larroche, C., Soccol, C.R., 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy* 88, 3291-3294.

Takahashi, T., Broecker, W.S., Langer, S., 1985. Redfield ratio based on chemical data from isopycnal surfaces. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 90, 6907-6924.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1989. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution* 58, 19-34.

Toro, J.E., 1989. The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquaculture Research* 20, 249-254.

Tredici, M.R., 2002. Bioreactors, Photo., *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. John Wiley & Sons, Inc.

Tripathi, R., Singh, J., Thakur, I.S., 2015. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy* 74, 774-781.

Turner, A.M., Chislock, M.F., 2010. Blinded by the stink: Nutrient enrichment impairs the perception of predation risk by freshwater snails. *Ecological Applications* 20, 2089-2095.

Tyagi, R., Kumar, A., Tyagi, M.B., Jha, P.N., Kumar, H.D., Sinha, R.P., Hader, D.P., 2003. Protective role of certain chemicals against UV-B-induced damage in the nitrogen-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum*. *J Basic Microbiol* 43, 137-147.

Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2, 012701.

USEPA, 2011. Principles of design and operations of wastewater treatment pond systems for plant operators, engineers, and managers. USA.

- Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodriguez, C.M., de- Bashan, L.E., Bashan, Y., 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research* 36, 4185-4192.
- Walter, A., 2011. Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo, Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Wang, B., Lan, C.Q., 2011. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology* 102, 5639-5644.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R., 2010. Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 1174-1186.
- Wang, L., Nancollas, G.H., 2008. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. *Chemical reviews* 108, 4628-4669.
- Wang, M., Kuo-Dahab, W.C., Dolan, S., Park, C., 2014. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresour Technol* 154, 131-137.
- Wong, C.Y., Teoh, M. L., Phang. S. M., L., C.W., 2011. Effects of ultraviolet radiation (UVR) on the tropical microalgae *Chlorella vulgaris*. *Malaysian Journal of Science* 30, 3-15.
- Yaakob, Z., Fakir, K., 2011. An Overview of Microalgae as a Wastewater Treatment, Jordan International Energy Conference, Amman.
- Zhou, W., Li, Y., Min, M., Hu, B., Chen, P., Ruan, R., 2011. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 6909-6919.

A.Anexos: Material e métodos

A.1 Esquema da instalação piloto utilizada

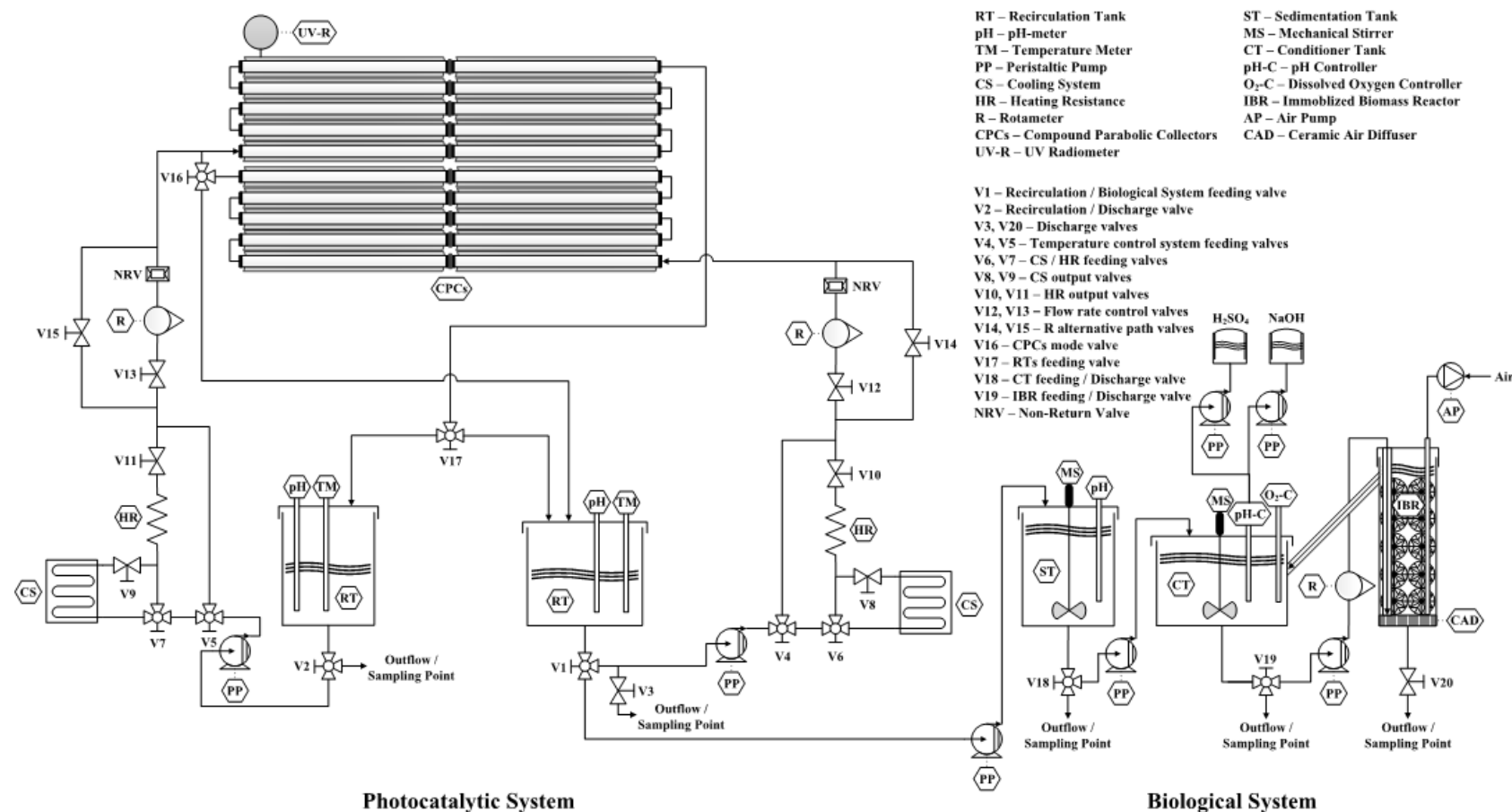


Figura A.1 - Esquema da instalação piloto utilizada.

A.2 Instalação piloto

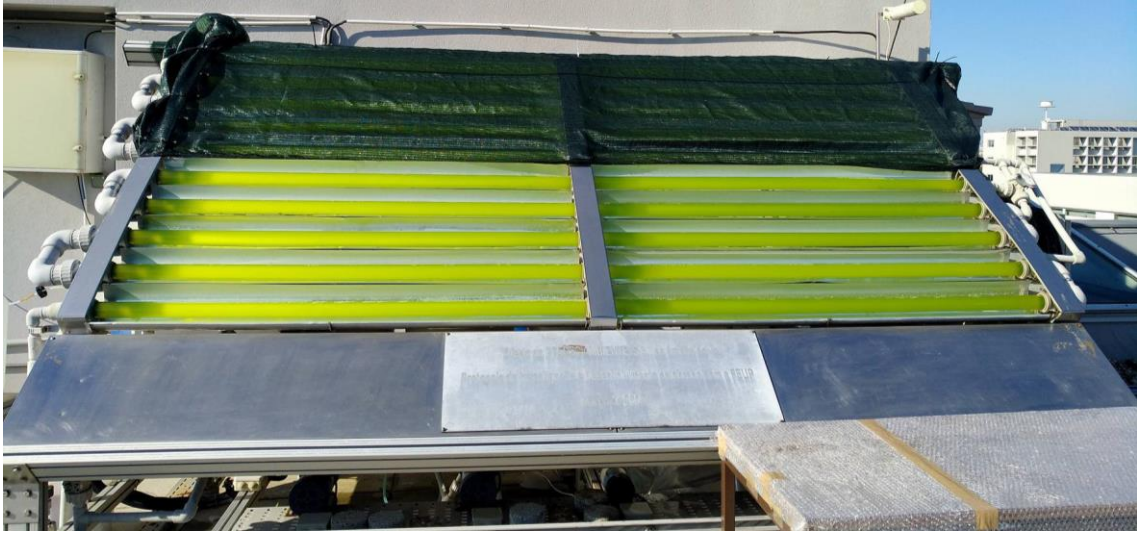


Figura A.2 - Instalação experimental no último dia de cultivo do ensaio I.

A.3 Procedimento experimental de peso seco

Diariamente e em simultâneo com as medições de DO, foram transferidos para cadinhos próprios (de tara conhecida, m_{tara}) dois volumes de 100 mL de cada um dos fotobiorreatores. Os cadinhos que continham as amostras de 100 mL foram secos a 105 °C, durante aproximadamente 24 h e posteriormente foram transferidos para um exsicador (onde permaneceram cerca de 1 h). Após o exsicador, as suas massas foram pesadas e registadas (m_1). De seguida, os cadinhos foram colocados numa mufla a 550 °C durante 2 h. Decorrido este tempo, os cadinhos foram arrefecidos lentamente, retirados para um exsicador (por mais 1 h), e voltaram a ser pesados (m_2). A diferença entre a tara e a massa m_1 equivale aos sólidos suspensos totais presentes na amostra. Já a diferença entre as duas últimas massas registadas ($m_1 - m_2$) equivale à massa de sólidos suspensos voláteis presentes nos 100 mL de amostra. A concentração da biomassa em peso seco foi calculada pelo quociente entre $m_1 - m_2$ e o volume de amostra retirado.

A.4 Cálculo do erro padrão

O erro padrão dos parâmetros dos modelos foi determinada através do produto entre o valor do *t-student* (obtido para um intervalo de confiança de 95%) e o desvio padrão do parâmetro obtido pelo modelo.

B. Resultados e discussão

B.1 Ensaio I

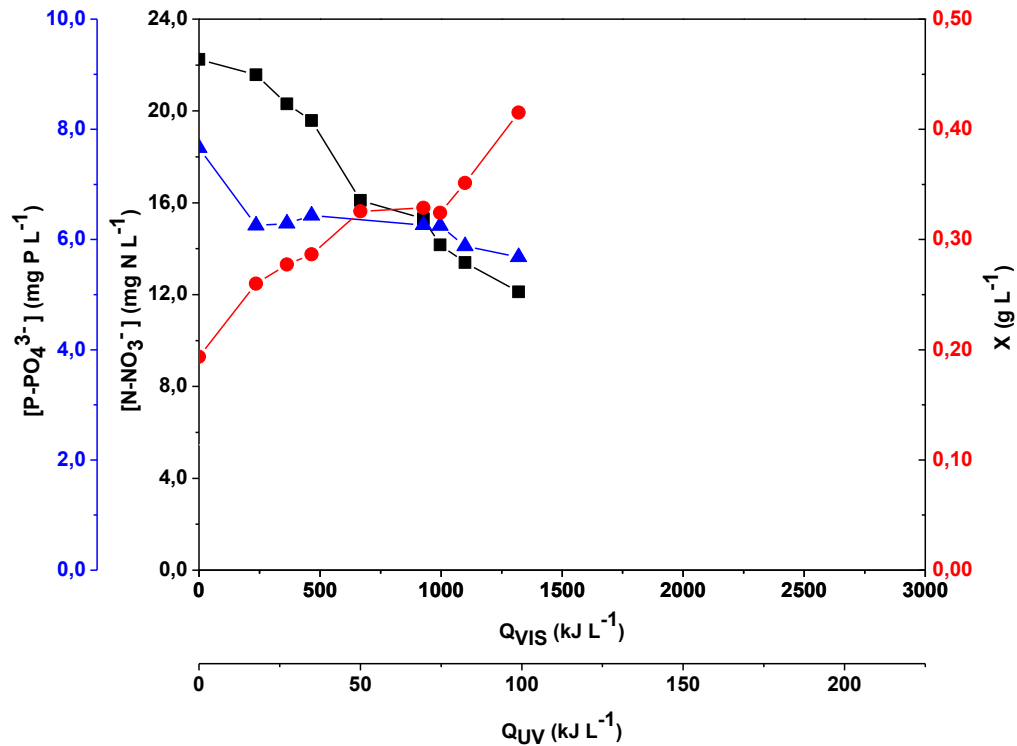


Figura B.1 - Resultados obtidos no ensaio I, FBR1.

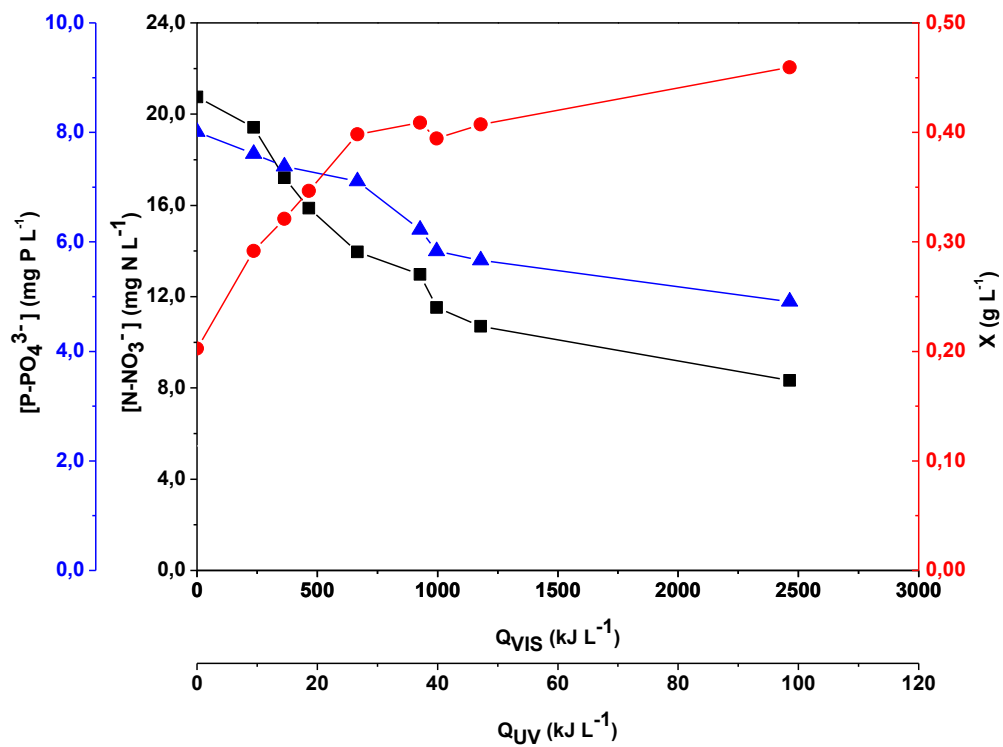


Figura B.2 - Resultados obtidos no ensaio I, FBR2.

B.2 Ensaio II

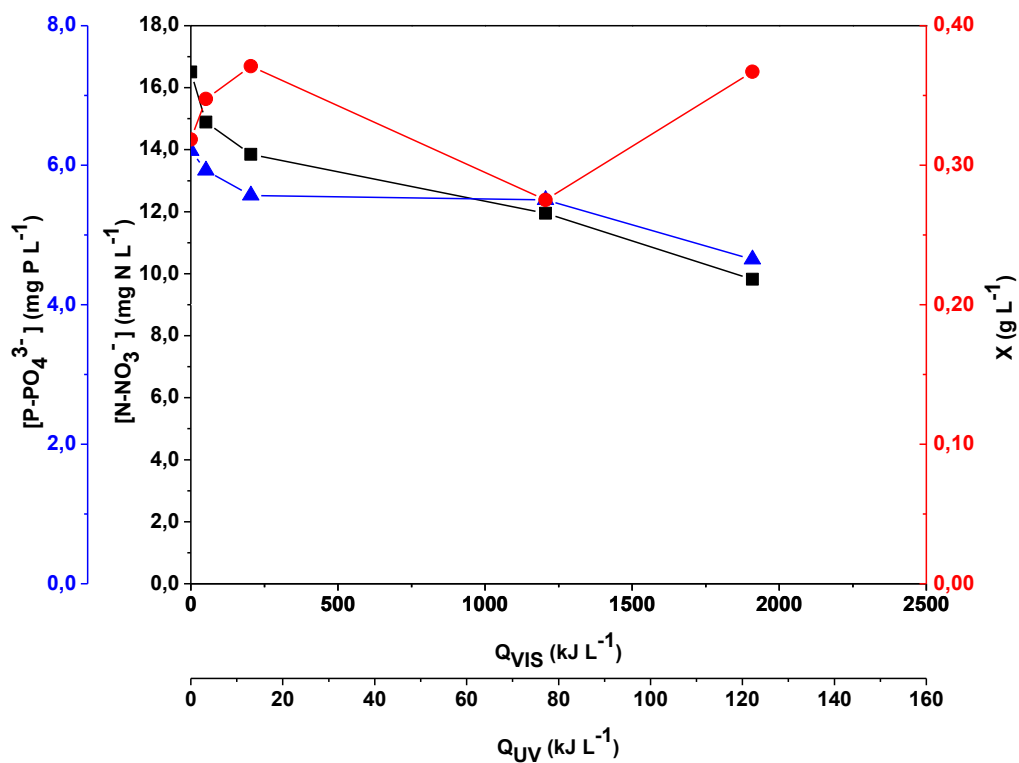


Figura B.3 - Resultados obtidos no ensaio II, FBR1.

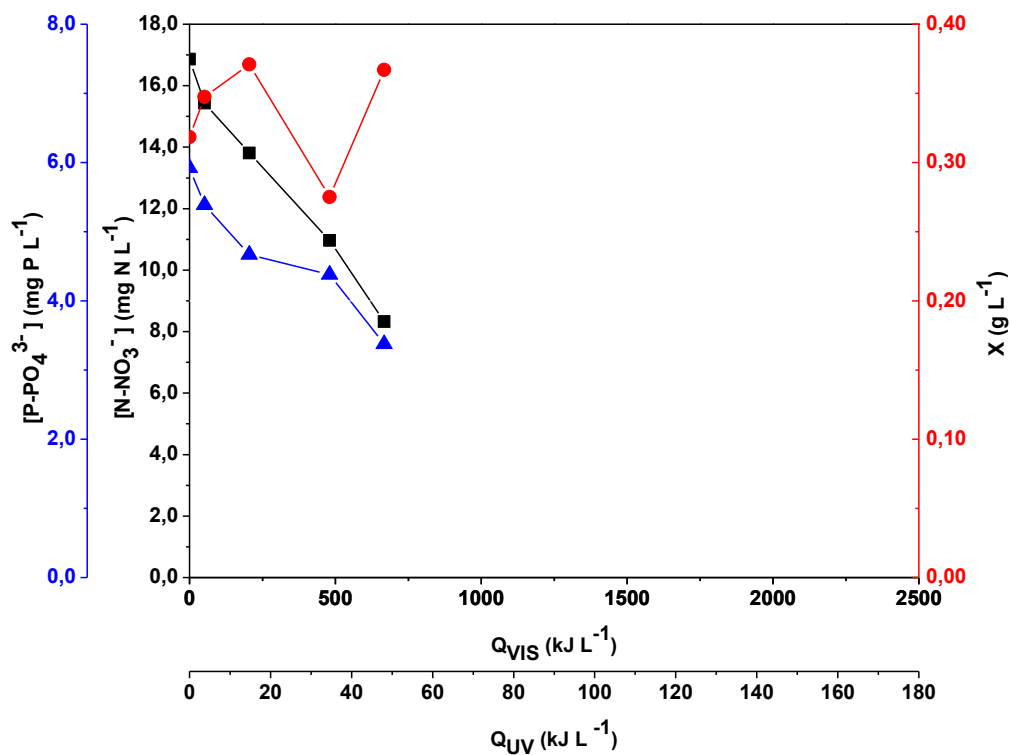


Figura B.4 - Resultados obtidos no ensaio II, FBR2.

B.3 Ensaio III

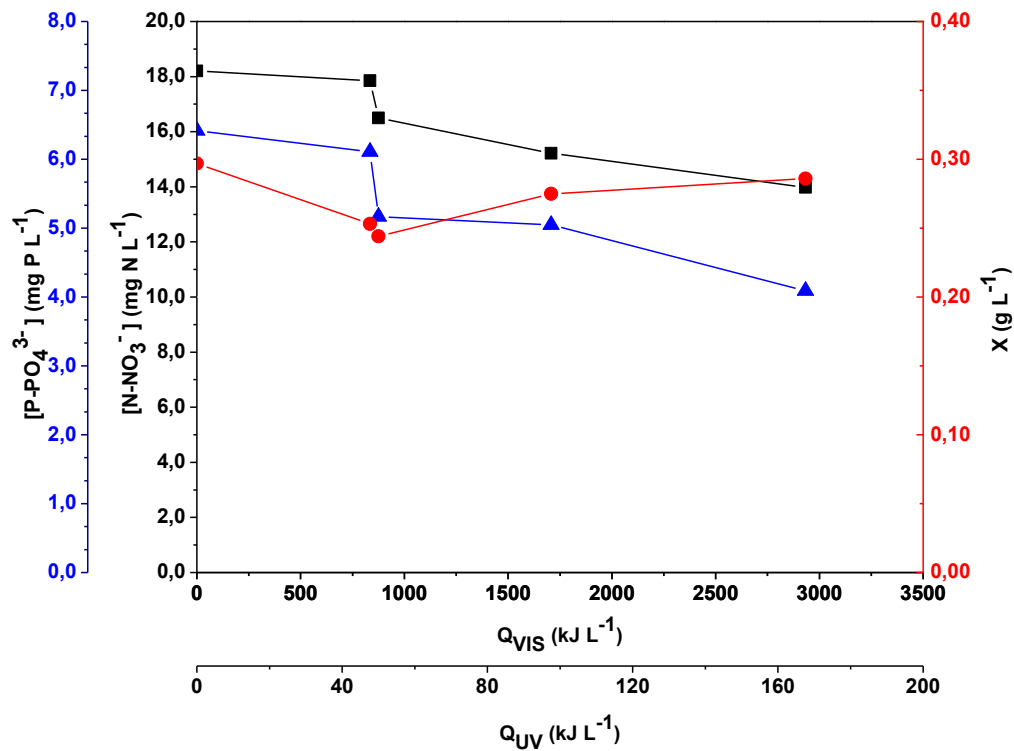


Figura B.5 - Resultados obtidos no ensaio III, FBR1.

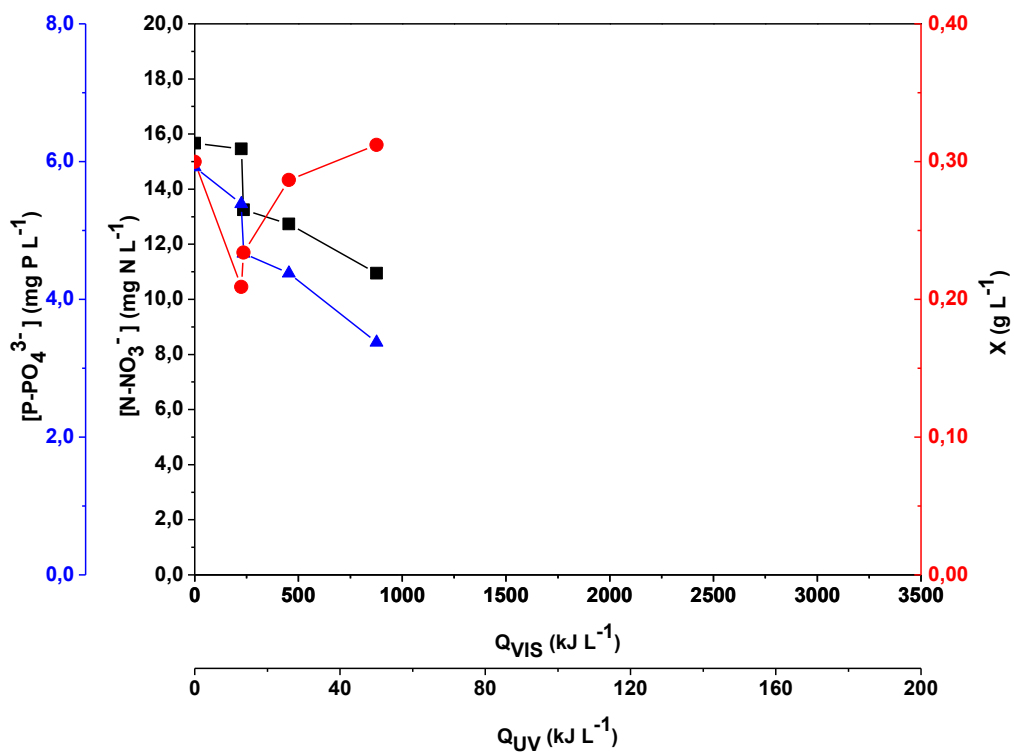


Figura B.6 - Resultados obtidos no ensaio III, FBR2.

B.4 Ensaio IV

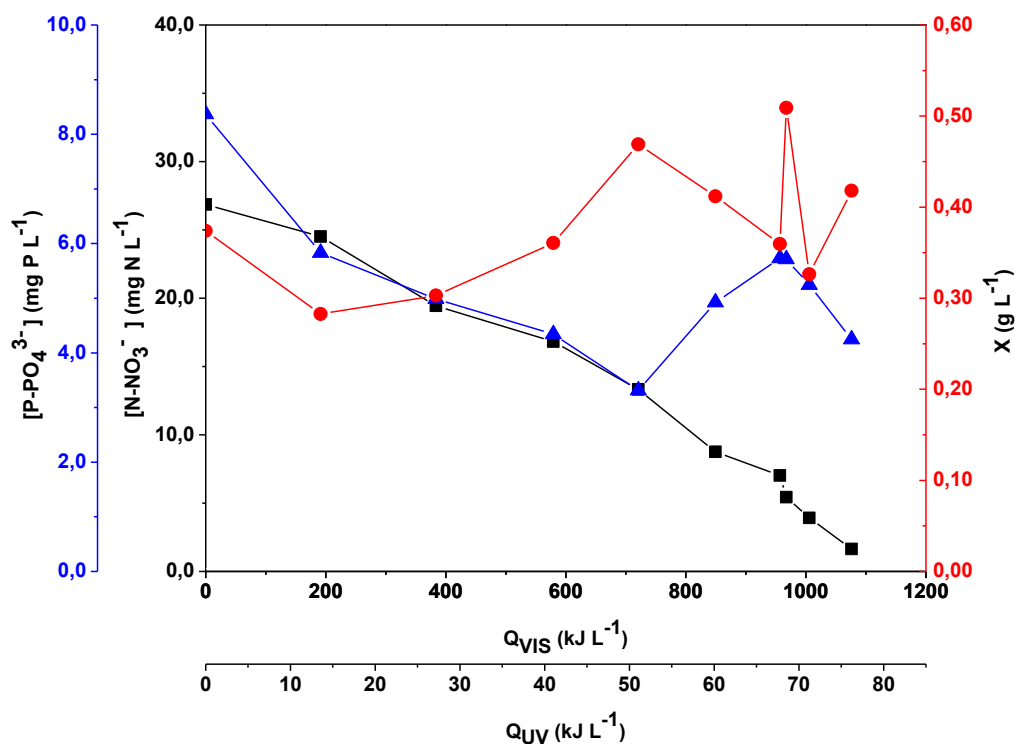


Figura B.7 - Resultados obtidos no ensaio IV, FBR1.

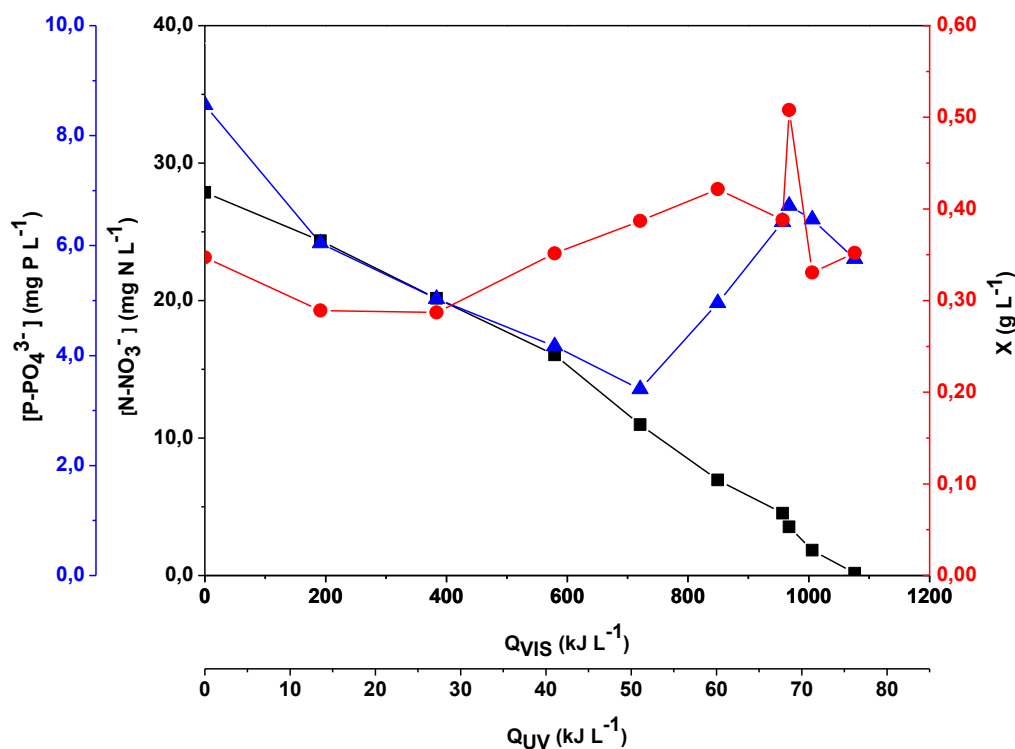


Figura B.8 - Resultados obtidos no ensaio IV, FBR 2.

B.5 Ensaio V

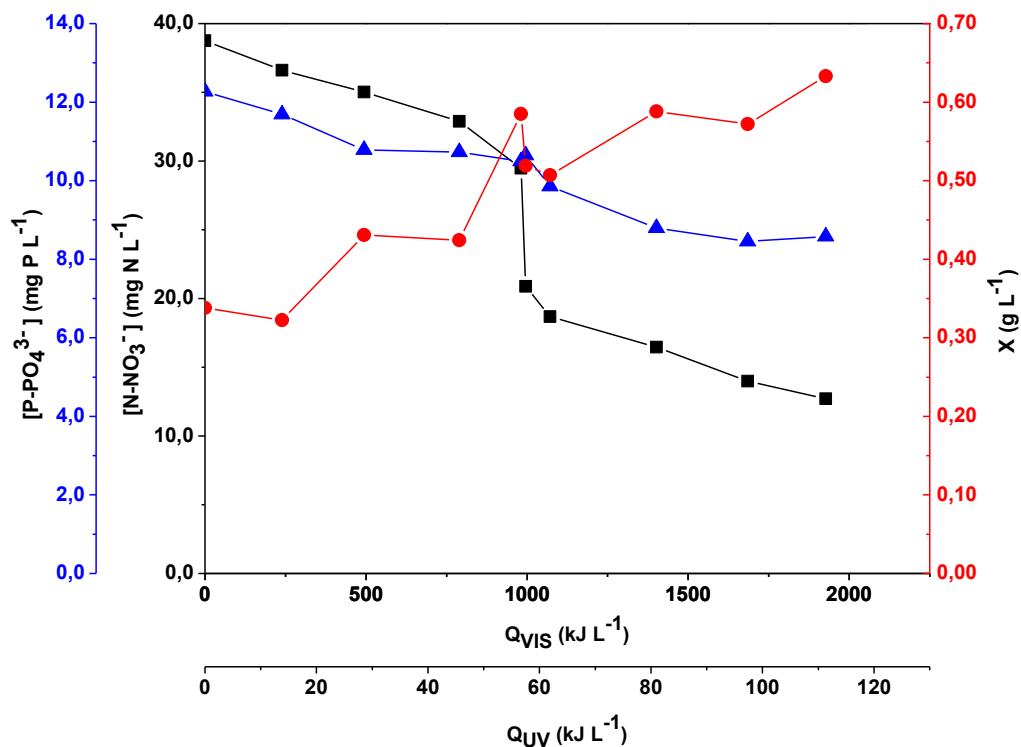


Figura B.9 - Resultados obtidos no ensaio V, FBR1.

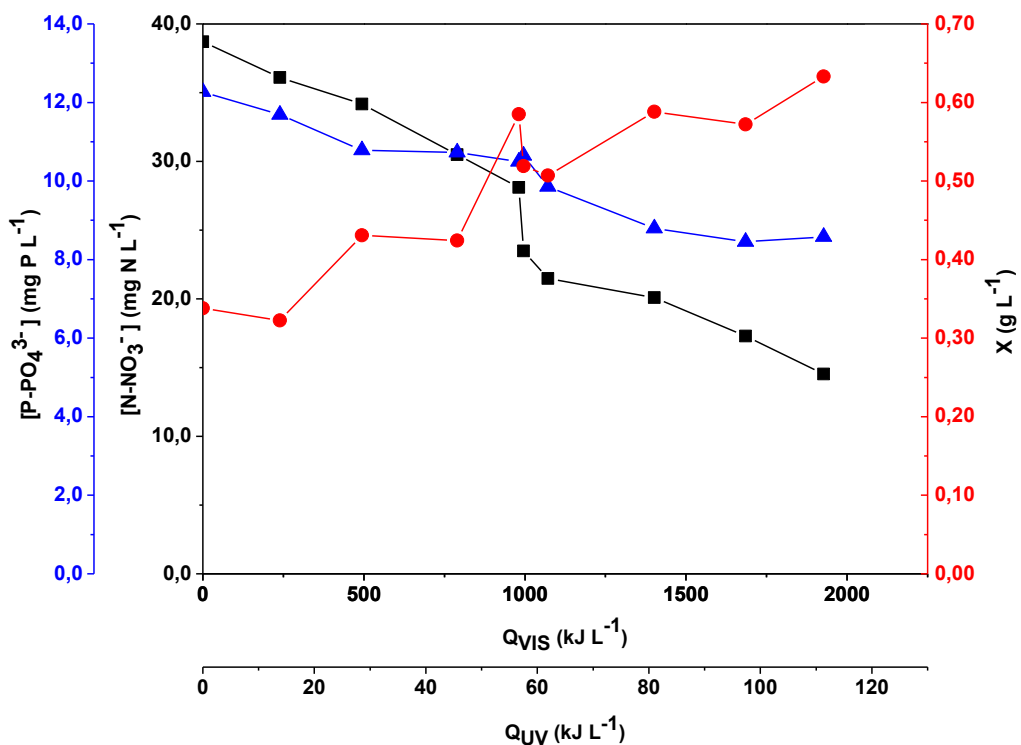


Figura B.10 - Resultados obtidos no ensaio V, FBR2.

B.6 Variação da concentração de Cálcio e Fósforo no ensaio IV

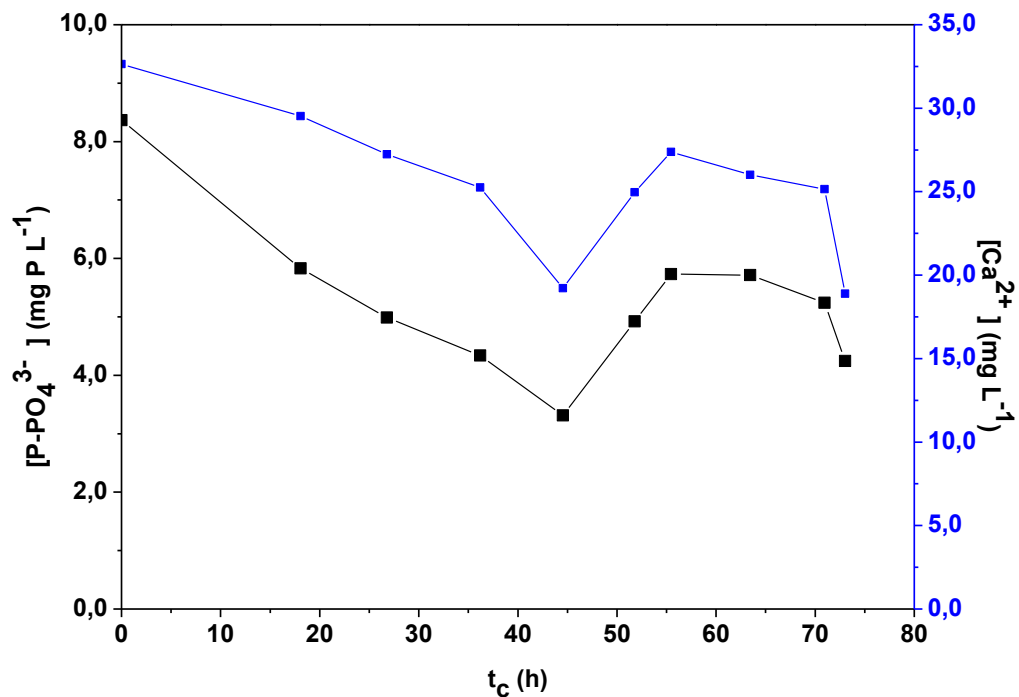


Figura B.11 - Evolução da concentração de fósforo e cálcio em função do tempo, no FBR1.

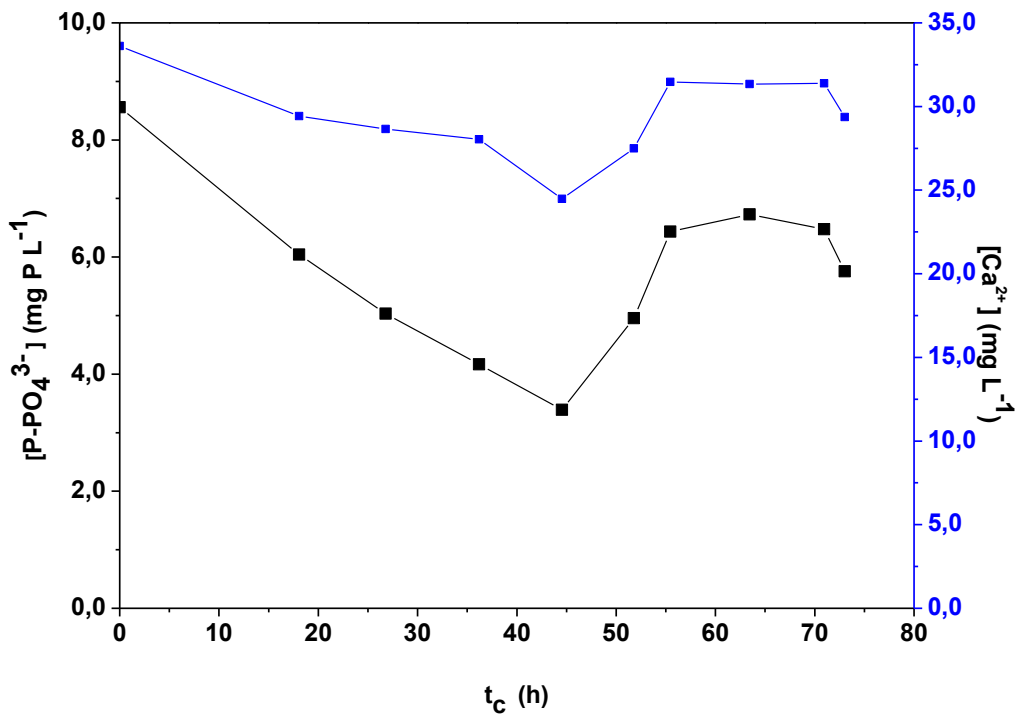


Figura B.12 - Evolução da concentração de fósforo e cálcio em função do tempo, no FBR2.